

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I

SCIENCES & GEOGRAPHIE

Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : **Biologie Structurale et Fonctionnelle**

Présentée par

Ludovic PECQUEUR

Etude du rôle du zinc et des cystéines dans la dimérisation
de la protéine FUR (Ferric Uptake Regulator) d'*E.coli* :
une approche structurale par RMN

Soutenue publiquement le 14 décembre 2005

JURY

Dr. Muriel DELEPIERRE
Dr. Isabelle SCHALK
Prof. Rob RUIGROK
Dr. Vincent FORGE
Dr. Beate BERSCH
Dr. Isabelle MICHAUD-SORET

Rapporteur
Rapporteur
Président du jury
Examineur
Co-Directeur de thèse
Directeur de thèse

N°

Thèse préparée au laboratoire de Physicochimie des Métaux en Biologie (UMR 5155 CNRS/CEA/UJF)),
Département de Réponse et Dynamique Cellulaires, CEA de Grenoble et au laboratoire de Résonance Magnétique
Nucléaire (UMR 5075 CNRS/CEA/UJF), Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Grenoble.

Remerciements

Je remercie les docteurs Muriel Delepierre et Isabelle Schalk d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie le professeur Rob Ruigrok d'avoir présidé mon jury de thèse ainsi que le docteur Vincent Forge d'avoir accepté de rapporter ce travail. Je les remercie tous pour leurs encouragements vis-à-vis de ce travail et concernant mon avenir professionnel.

Je remercie mon directeur de thèse, Isabelle Michaud-Soret de m'avoir pris pour réaliser ce travail, pour son humanité et pour son implication lors de la rédaction de ce mémoire.

Merci aux membres du laboratoire de Physico-chimie des métaux en biologie du CEA-Grenoble, dirigé par Jean-Marc Latour, de m'avoir accueilli et d'avoir supporté mes humeurs. Un grand merci plus particulièrement à Rutger Diederix, avec qui les discussions scientifiques ont toujours été intéressantes et constructives, ainsi qu'à Victor Duarte pour sa sympathie et les malheureusement trop peu nombreuses parties de tennis.

Je tiens à remercier les membres du laboratoire de RMN de l'Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel : Jean-Pierre Simorre qui m'a accepté dans son équipe; Beate Bersch pour la co-direction de thèse ; Bernhard Brutscher sans qui l'acquisition des différentes expériences RMN n'aurait pas été possible.. Merci à Dominique Marion et Martin Blackledge qui ont toujours été disponible lorsque j'avais une petite question à leur poser. Enfin, et surtout, un très grand merci à Laurence Blanchard et à Catherine Bougault, vous m'avez beaucoup porté durant ces dernières années. Merci pour votre humanité, votre amitié, votre soutien et pour le temps que nous avons passé à discuter jusqu'à parfois très tard dans la nuit.

Tout ce parcours n'aurait, bien sûr, pas été possible sans la bienveillance de mes parents et surtout de ma mère qui m'a permis de faire mes études, protégé du besoin, et qui m'a chaque jour montré son amour.

Pour terminer, merci Caroline d'être à mes côtés chaque jour et d'avoir supporté la difficile période de rédaction. Ton tour viendra, j'espère être à ta hauteur...

A la mémoire de mon père, disparu trop tôt mais présent à jamais dans ma mémoire.

Table des matières

CHAPITRE I LES METALLO-REGULATEURS TRANSCRIPTIONNELS DANS LES ORGANISMES PROCARYOTES	- 19 -
I.1 Plusieurs familles de métallobrégulateurs pour le contrôle de l'homéostasie de métaux	- 21 -
I.2 La famille des régulateurs SmtB/ArsR	- 22 -
I.2.1 Caractéristiques structurales des régulateurs de la famille SmtB/ArsR	- 23 -
I.2.2 Sites métalliques et activation	- 25 -
I.2.3 Interaction protéine / ADN	- 28 -
I.3 La famille des régulateurs MerR	- 29 -
I.3.1 Caractéristiques structurales des régulateurs transcriptionnels de la famille MerR	- 29 -
I.3.2 Mécanisme d'activation	- 31 -
I.4 La famille du régulateur NikR	- 32 -
I.5 La famille des régulateurs DtxR	- 34 -
I.5.1 Caractéristiques structurales des régulateurs transcriptionnels de la famille DtxR	- 35 -
I.5.2 Mécanisme d'activation	- 36 -
I.6 La famille des régulateurs de type FUR (Ferric Uptake Regulator)	- 39 -
I.7 La protéine FUR, un régulateur global	- 39 -
I.7.1 La découverte de FUR	- 39 -
I.7.2 Quelques caractéristiques sur la séquence de FUR	- 41 -
I.7.3 Caractéristiques biochimiques de FUR	- 43 -
I.7.4 Les domaines fonctionnels de FUR	- 44 -
I.7.5 Eléments de structure	- 44 -
I.7.6 Les sites métalliques	- 45 -
I.7.7 Mécanisme d'activation proposé de la protéine	- 47 -
I.7.8 Interaction protéine / ADN	- 48 -
I.7.9 Affinité protéine / ADN	- 50 -
I.7.10 La structure cristallographique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> FUR ($Zn_R Zn_S FUR_D$)	- 50 -
I.8 Bilan des comparaisons structurales des cinq familles de métallorégulateurs	- 52 -
I.9 Présentation du travail.	- 53 -
CHAPITRE II ETUDE STRUCTURALE D'UNE PROTEINE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	- 63 -
II.1 La RMN : limites et progrès technologiques	- 66 -
II.1.1 Limites imposées par la technique et l'échantillon biologique	- 66 -
II.1.2 Les progrès instrumentaux	- 68 -
II.1.3 Le marquage isotopique et la RMN hétéronucléaire	- 68 -
II.1.4 La deutération	- 69 -

II.2	Stratégie générale de résolution d'une structure de protéine par RMN	- 71 -
II.2.1	Préparation de l'échantillon biologique	- 72 -
II.2.2	Stratégie d'attribution des fréquences de résonances	- 74 -
II.2.3	Collection des contraintes structurales	- 78 -
II.2.4	Calcul de structure sous recuit simulé	- 89 -
II.3	Etude de la dynamique d'une protéine par la relaxation des noyaux ^{15}N	- 91 -
II.3.1	Les paramètres R_1 et R_2	- 91 -
II.3.2	Le paramètre NOE	- 92 -
II.3.3	Extraction des paramètres de dynamique	- 94 -
CHAPITRE III ETUDE STRUCTURALE DU DIMERE DE $\text{Zn}_\text{S}\text{FUR}_\text{D}$ D'<i>E. COLI</i> PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE		- 101 -
III.1	Caractérisation préliminaire de FUR d'<i>E. coli</i>	- 103 -
III.1.1	Analyse de la séquence primaire de FUR	- 103 -
III.1.2	Tests préliminaires RMN de FUR d' <i>E. coli</i>	- 104 -
III.2	Préparation des échantillons $\text{Zn}_\text{S}\text{FUR}_\text{D}$ d'<i>E. coli</i>	- 105 -
III.3	Attribution des résonances de $\text{Zn}_\text{S}\text{FUR}_\text{D}$	- 106 -
III.3.1	Attribution de la chaîne principale et détermination des structures secondaires	- 106 -
III.3.2	Attribution des résonances des chaînes latérales	- 109 -
III.4	Collection des contraintes structurales	- 110 -
III.4.1	Analyse des NOEs observés pour le dimère	- 110 -
III.4.2	Mesure des couplages dipolaires résiduels dans la chaîne polypeptidique	- 114 -
III.5	Discussion	- 120 -
III.5.1	Comparaison de la structure cristallographique de FUR de <i>P. aeruginosa</i> ($\text{Zn}_\text{R}\text{Zn}_\text{S}\text{FUR}_\text{D}$) avec les données RMN obtenues sur l'apo dimère de FUR d' <i>E. coli</i> ($\text{Zn}_\text{S}\text{FUR}_\text{D}$)	- 120 -
III.5.2	Comparaison avec d'autres protéines appartenant à des familles de métallo-régulateurs	- 125 -
CHAPITRE IV ETUDE DU PASSAGE MONOMERE/DIMERE		- 129 -
IV.1	Les données biochimiques sur le monomère de FUR	- 131 -
IV.2	Etude de la dimérisation par dichroïsme circulaire	- 135 -
IV.3	Etude de la dimérisation par RMN	- 138 -
IV.4	Attribution des résonances du monomère oxydé de FUR de <i>E. coli</i>	- 141 -
IV.5	Comparaison des données de relaxation hétéronucléaire ^1H-^{15}N du dimère et du monomère	- 144 -
IV.6	Conclusions sur le processus de dimérisation et proposition d'un modèle de dimérisation	- 145 -

CHAPITRE V LIAISON DU METAL	- 149 -
V.1 Etude de la liaison du métal des formes monomérique et dimérique	- 151 -
V.1.1 Rappel sur les propriétés des sites de régulation du dimère et du monomère	- 151 -
V.1.2 Etude structurale de l'activation de FUR _M et Zn _R FUR _D par le zinc	- 155 -
V.2 Conclusions	- 163 -
CHAPITRE VI INTERACTIONS PROTEINES/ADN	- 165 -
VI.1 Le test de protection à la nucléase : Un monomère activable sous certaines conditions	- 167 -
VI.2 Etude des interactions protéines / ADN par anisotropie de fluorescence	- 171 -
VI.3 Etude de la protéine tronquée FUR₁₋₈₂	- 180 -
VI.3.1 Etude de la liaison à l'ADN	- 180 -
VI.3.2 Etude de la forme tronquée FUR ₁₋₈₂ par RMN	- 182 -
VI.3.3 Structure cristallographique de FUR ₁₋₈₂	- 184 -
VI.4 Discussion	- 188 -
CHAPITRE VII DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS	- 191 -
VII.1 Résumé du travail réalisé	- 193 -
VII.2 Discussion sur les changements structuraux responsables de l'activation du dimère de FUR : rôle de l'hélice $\alpha 1$	- 195 -
VII.3 Discussion sur l'activation par les ions métalliques	- 198 -
VII.4 Discussion sur la liaison à l'ADN du monomère et du dimère	- 201 -
CHAPITRE VIII MATERIEL ET METHODE	- 207 -
VIII.1 Surexpression de la protéine marquée en milieu minimum M9	- 209 -
VIII.1.1 Cas de FUR marquée ¹⁵ N et ¹⁵ N / ¹³ C-FUR	- 210 -
VIII.1.2 Cas de FUR marquée ² H / ¹⁵ N / ¹³ C-FUR	- 210 -
VIII.2 Extraction et purification de FUR	- 211 -
VIII.2.1 Obtention des Extraits protéiques	- 211 -
VIII.2.2 La colonne d'affinité	- 211 -
VIII.2.3 Purification sur colonne de filtration sur gel	- 212 -
VIII.2.4 Détermination du taux de marquage	- 212 -
VIII.3 Test de protection à la coupure	- 213 -
VIII.4 Anisotropie de Fluorescence	- 215 -
VIII.5 Dichroïsme circulaire	- 216 -
VIII.5.1 Passage monomère-dimère	- 216 -
VIII.5.2 Titration en métal	- 217 -

VIII.6 Construction de FUR₁₋₈₂	- 217 -
VIII.7 Culture et purification de FUR₁₋₈₂	- 218 -
VIII.8 RMN et cristallographie de FUR₁₋₈₂	- 219 -
VIII.8.1 Spectre ¹ H- ¹⁵ N HSQC de FUR ₁₋₈₂	- 219 -
VIII.8.2 Cristallographie	- 219 -
VIII.9 Spectroscopie RMN sur le dimère	- 220 -
VIII.9.1 Attribution des résonances de la chaîne principale	- 220 -
VIII.9.2 Attribution des résonances des chaînes latérales	- 221 -
VIII.9.3 Attribution des NOEs	- 222 -
VIII.9.4 Mesure des NOEs hétéronucléaires	- 222 -
VIII.9.5 Mesure des couplages résiduels dipolaires	- 223 -
VIII.10 Spectroscopie RMN sur le monomère	- 224 -
VIII.11 Titration du monomère et du dimère par du Zn²⁺ et suivi par RMN	- 225 -
VIII.12 Détermination de la stoechiométrie protéine/ADN par EMSA	- 225 -
Annexe A	-231-
Annexe B	-261-

Table des illustrations

Figure I.1 : Représentation en ruban de la structure cristallographique de apo-SmtB. L'interface de dimérisation est composée des hélices $\alpha 1$ et $\alpha 5$ de chaque sous unité. L'hélice de reconnaissance de l'ADN (en rouge) est constituée de l'hélice $\alpha 4$.	- 24 -
Figure I.2 : Localisation des sites métalliques de SmtB. <i>Synechococcus PCC 7942</i>	- 26 -
Figure I.3 : Superposition des structures de apo-SmtB (bleue) et du triple mutant [C14S, C61S,C121S] $\alpha 5$ -SmtB 2 Zn(II) (rouge) par rapport à une sous-unité de l'apo protéine. Lors de l'activation de la protéine par 2 ions de Zn(II), seuls des changements quaternaires interviennent correspondant à des mouvements de rotation/translation de corps rigide d'une sous-unité par rapport à l'autre (40). On voit bien les mouvements importants de l'hélice $\alpha 4$ et de la boucle reliant les brins β_1 et β_2 .	- 27 -
Figure I.4 : Superposition des structures de apo-CzrA (bleue) et Zn(II)-CzrA (rouge). La liaison du métal n'engendre pas de changement conformationnel majeur.	- 27 -
Figure I.5 : Réseau de liaison hydrogène intervenant dans la régulation de l'activité de SmtB. Le réseau de liaison hydrogène prend son origine avec l'azote de l'histidine 117 Ne2 n'intervenant pas dans la liaison du métal et se poursuit jusqu'à la Leu88 proche de l'hélice de reconnaissance pour l'ADN (40). Les sphères indiquent les atomes impliqués dans le réseau.	- 28 -
Figure I.6 : Exemple de motifs 12-2-12 d'un promoteur reconnu par SmtB de type S1/S2 (20).	- 28 -
Figure I.7 : Structure tridimensionnelle obtenue par diffraction des rayons X de deux membres de la famille MerR : Cu(I)-CueR (à gauche, (25)) et de Zn(II)-ZntR (à droite, (25)). Les protéines de la famille MerR possèdent 3 domaines : un domaine de liaison à l'ADN (en rouge) de type hélice-coude-hélice ailé comportant une première aile W1 et une seconde aile W2 ; un domaine de jonction (en vert) permettant la dimérisation par la formation d'un coiled-coil de longueur variable ; un domaine d'activation (en bleu).	- 30 -
Figure I.8 : Structure tridimensionnelle obtenue par diffraction des rayons X des complexes ADN/protéine : BmrR (à gauche, (62)) et MtaN (à droite, (78)). Domaine de liaison à l'ADN (en rouge) ; domaine de jonction (en vert) ; domaine d'activation (en bleu).	- 31 -
Figure I.9 : Schéma d'action de MerR. (issu de (16)). A) En absence de métal, les régions -35 et -10 du promoteur ne sont pas en phase empêchant ainsi l'ARN polymérase de transcrire le ou les gènes sous le contrôle du promoteur. B) En présence de Hg(II), MerR change de conformation en imposant à l'ADN une torsion permettant de mettre en phase les régions -35 et -10. Dans ces conditions, l'ARN polymérase peut commencer la transcription.	- 31 -
Figure I.10 : Superposition des structures de MtaN cristallisées en absence d'ADN (verte) et en présence d'ADN (bleue) (78))	- 32 -
Figure I.11 : A) Structure de apo NikR, B) et C) structures de formes métallées par le nickel(II) (sphère jaune, grise et rouge) de <i>Pyrococcus horikoshii</i> (29).	- 33 -
Figure I.12 : Mécanisme d'activation par le nickel(II) avec basculement des domaines de liaison à l'ADN, proposé par P. Chivers et al.(29).	- 34 -
Figure I.13 : Structure cristallographique de IdeR cristallisée en présence de Co(II) et d'ADN (90). Seule la structure d'un dimère du complexe est montrée pour plus de clarté. Les atomes de Co(II) sont en jaune, le domaine de liaison à l'ADN est en rouge, le domaine de dimérisation en vert et le domaine SH3 en cyan. L'hélice $\alpha 3$ est l'hélice de reconnaissance de l'ADN.	- 35 -
Figure I.14 Modèle proposé d'activation de apo IdeR (issu de (30))	- 36 -

- Figure I.15 : Superposition des formes apo (bleue) (89) et du complexe Co(II)DtxR/ADN (rouge) (90) en présence de Co^{2+} de DtxR. Les ions Co(II) sont visualisés en jaune sur cette figure. Les domaines SH3 ne sont pas visualisés pour plus de clarté. L'ADN du complexe n'est pas visualisé. - 37 -
- Figure I.16 : Structure du complexe DtxR/ADN. Le complexe est un dimère de dimère sur l'ADN. Les différents domaines d'un monomère de DtxR sont représentés en rouge (domaine de liaison à l'ADN), vert (domaine de dimérisation) et cyan (domaine de type SH3). Les atomes de Co(II) sont en jaune. Les domaines SH3 ne sont pas visualisés sur le dimère du haut pour plus de clarté. - 38 -
- Figure I.17 : Représentation schématique du mécanisme de contrôle de l'acquisition du fer par FUR dans la bactérie. Lorsque la bactérie est en carence de fer, elle synthétise des sidérophores qui vont complexer le Fe^{3+} avec une forte affinité. Le complexe est ensuite pris en charge par des systèmes de transport spécifiques puis internalisé dans la bactérie. Le Fe^{3+} est libéré par réduction puis le Fe^{2+} est pris en charge pour être soit stocké soit utilisé. A l'équilibre, la quantité de fer dont dispose la cellule est suffisante. Dans ces conditions, la protéine FUR est active et réprime l'expression de tous les gènes impliqués dans l'acquisition du fer. - 40 -
- Figure I.18 : Séquence peptidique de FUR d'*E.coli* (GenBank). La méthionine N terminale n'est pas indiquée du fait de son excision par la bactérie - 41 -
- Figure I.19 : Alignement des séquences de protéines FUR de différents micro-organismes obtenu à partir de la banque de données GenBank. Les acides aminés en rouge sont des ligands potentiels. - 42 -
- Figure I.20 : Comparaison de la prédiction de structure secondaire obtenue avec Jpred (34, 56) avec les données RMN obtenue par Saito et al. (95). La prédiction de structure avec le serveur JPred suggère la présence d'un motif de liaison à l'ADN de type hélice-coude-hélice ailé. Les données RMN et la prédiction de structure ne sont pas en accord. - 44 -
- Figure I.21 : Structure proposée pour le site à zinc de FUR d'*E.coli*. Le zinc est tétracoordonné dans une géométrie tétraédrique par deux soufres provenant des cystéines C92 et C95 et par un azote provenant d'une histidine. Le 4^{ème} ligand est un oxygène ou un azote (66). - 45 -
- Figure I.22 : Structure proposée du site d'activation de FUR occupé par du Fe(II). L'environnement du fer est intermédiaire entre penta et hexacoordonné dans une géométrie octaédrique. Il comprend 3 azotes dont deux proviendraient d'histidines, un oxygène provenant d'un acide aminé. Les autres atomes sont des oxygènes et/ou des azotes. - 46 -
- Figure I.23 : Mécanisme schématique d'activation de FUR dimère. Un dimère de FUR contenant 1 atome de zinc par sous-unité (Zn_RFUR_D) est activé par la reconnaissance de fer ferreux. La liaison du métal entraîne un changement de conformation avec l'augmentation de l'exposition au solvant d'une partie du domaine N-terminal de FUR (notamment l'hélice de reconnaissance α_R) qui peut alors se lier à sa séquence spécifique d'ADN. Le domaine de liaison à l'ADN est représenté en violet, le domaine de dimérisation en rouge. L'hélice α en bleu correspond à l'hélice d'interaction avec l'ADN. - 47 -
- Figure I.24 : Séquence consensus palindromique ou « iron-box » déterminée par Escolar et al. (44). - 48 -
- Figure I.25 : Interprétations possibles de la séquence consensus palindromique. Modèle A : la séquence correspond à la répétition inversée d'un motif de 9 pb. Modèle B : la séquence correspond à la répétition d'un motif hexamérique dont deux en sens direct et un inversé. Modèle C : la séquence correspond à la répétition d'un motif de 7 pb avec recouvrement. - 50 -
- Figure I.26 : Structure cristallographique du dimère de *Pseudomonas aeruginosa* FUR ayant incorporée du zinc dans le site régulateur ($\text{Zn}_R\text{Zn}_S\text{FUR}_D$). Une sous-unité est représentée en magenta. Dans l'autre sous-unité, le domaine de liaison à l'ADN (en rouge) est constitué d'un motif hélice-coude-hélice ailé dans lequel α_4 est l'hélice d'interaction avec l'ADN. Le domaine de dimérisation (en vert) est formé d'un long brin bêta (β_5) et d'une hélice (α_5) à l'origine des interactions inter-sous-unité. Le zinc du site structural est représenté en bleu et celui du site régulateur en rouge. - 51 -
- Figure I.27 : Sites métalliques de *P.aeruginosa* FUR d'après la structure cristallographique et les données XAS. A) Site structural B) Site régulateur - 52 -

Figure II.1 : Spectre 1D ^1H de 3 protéines de tailles différentes. L'augmentation du nombre de résidus entraîne une augmentation des superpositions sur le spectre.....	- 67 -
Figure II.2 : Comparaison du signal observé en fonction de la taille de la molécule. La largeur à mi-hauteur du pic de corrélation est proportionnelle à la vitesse de relaxation transversale R_2 elle-même proportionnelle au temps de corrélation τ_c de la molécule.	- 68 -
Figure II.3 : Comparaison des T_2 des différents noyaux en fonction du τ_c de la molécule et de la deutération (issue de (52))	- 70 -
Figure II.4 : Diminution de la densité de proton due à la deutération et expliquant la diminution de la diffusion de spin. Les flèches en pointillés correspondent aux interactions ^1H - ^1H à l'origine de la diffusion de spin. (reproduit d'après (4)).....	- 70 -
Figure II.5 : Les différentes étapes d'une étude RMN (issue de(42))	- 72 -
Figure II.6 : Valeurs en Hertz des constantes de couplages ^1J et ^2J utilisées pour les transferts d'aimantation dans les protéines marquées ^{15}N et ^{13}C	- 74 -
Figure II.7 : Exemple de zones spectrales d'expériences 3D triple résonance extraites pour une valeur de fréquence ^1H ^{15}N correspondant à un pic de corrélation sur l'HSQC. On met en évidence la méthode d'attribution et le mode d'interprétation des spectres.....	- 75 -
Figure II.8 : Chemin de transfert d'aimantation suivi lors des expériences d'attribution 3D utilisées pour une protéine deutérée. Les fréquences obtenues pour chaque expérience correspondent aux noyaux entourés en gris. Chaque cadre délimite un résidu.	- 76 -
Figure II.9 : Schéma représentant les fréquences de résonances attribuées pour chaque expérience. On notera la redondance de certaines fréquences permettant de déduire l'enchaînement des noyaux le long de la chaîne polypeptidique. Les cases grises correspondent à des noyaux qui ne sont pas observables.....	- 76 -
Figure II.10 : Principe des expériences permettant l'attribution des chaînes latérales.....	- 78 -
Figure II.11 : NOEs ^1H observables (doubles flèches) dans les différentes structures secondaires. a) hélice α ; b) feuillet β antiparallèle ; c) feuillet β parallèle ; d) coude β type I ; e) coude β type II (issue de(6)).....	- 80 -
Figure II.12 : Angle θ utilisé dans le calcul du couplage dipolaire $\cos \theta = \vec{e}_{\text{IS}} \cdot \vec{e}_Z$	- 81 -
Figure II.13 : Vecteur internucléaire IS représenté dans son tenseur d'alignement A. Les angles α_x , α_y , α_z sont les angles d'Euler caractérisant la rotation du repère du tenseur d'alignement par rapport au champ magnétique statique B_0	- 82 -
Figure II.14 : Le couplage dipolaire résiduel est dégénéré. Une valeur peut correspondre à plusieurs orientations possibles comme le montre le tracé A par exemple. La dégénérescence est levée avec l'utilisation d'un second milieu cristal liquide n'ayant pas les mêmes propriétés que le premier. On obtient alors deux jeux de données avec des tenseurs d'alignement différents qui vont permettre de trouver l'orientation du vecteur observé (issu de (1)).....	- 83 -
Figure II.15 : Représentation schématique de la morphologie de bicelles dans une phase cristal liquide lamellaire (issue de (12)).	- 84 -
Figure II.16 : Schéma représentant l'alignement des phages dans un champ magnétique B_0	- 85 -
Figure II.17 : dédoublement quadrupolaire en fonction de la concentration en phages. (issu de (18)).....	- 86 -
Figure II.18 : Représentation schématique de la morphologie de C_mE_n /hexanol dans une phase cristal liquide lamellaire (issue de (12)).....	- 87 -

Figure II.19 : A) Gamme de température utilisable pour les mélanges afin d'obtenir une phase lamellaire stable. B) Dédoublage quadrupolaire du D ₂ O mesuré en fonction de la quantité de mélange C _m E _n /alcool/H ₂ O. C) Dédoublage quadrupolaire du D ₂ O mesuré en fonction de la température. (issue de (38))	- 87 -
Figure II.20 : A) et B) Compression longitudinale à l'aide d'un piston du gel de polyacrylamide. C) Compression radiale du gel à l'aide du système développé par Chou et <i>al.</i> (7) (issue de (1))	- 88 -
Figure II.21 : Angles de torsions phi (φ) et psi (ψ)	- 89 -
Figure II.22 : Courbe de Karplus dans le cas du couplage ³ J _{HNHα}	- 89 -
Figure II.23 : Exploration de l'espace conformationnel lors du calcul de structure (issue de « Making truth » de Thomas L.Brown). Durant le recuit simulé, le système peut atteindre plusieurs puits de potentiels intermédiaires puis en sortir avant d'atteindre un puit de potentiel dont l'énergie est minimale.	- 90 -
Figure II.24 : Transitions possibles dans un système à deux spins.	- 92 -
Figure II.25 : Variation du paramètre NOE ¹ H- ¹⁵ N en fonction du τ _c du vecteur N-H. le NOE hétéronucléaire ¹ H- ¹⁵ N permet d'identifier des mouvement dans la gamme [10 ⁻¹⁰ : 10 ⁻⁸] s.	- 93 -
Figure II.26 : Fonction de densité spectrale obtenue en fonction du temps de corrélation de la molécule.	- 94 -
Figure III.1 : Prédiction de structure secondaire de FUR d' <i>E.coli</i> réalisée sur JPred (5, 13)	- 104 -
Figure III.2 : Spectre HSQC ¹ H- ¹⁵ N de Zn ₅ FUR _D à 2,6 mM dans MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7.5 DTT 10 mM à 298 K. Le spectre montre une bonne dispersion des résonances indiquant que la protéine est structurée. On dénombre ~150 pics sans compter les NH ₂ des chaînes latérales des Asn et Gln correspondant approximativement au nombre de résidus par monomère indiquant que le dimère est symétrique.	- 105 -
Figure III.3 : A) Profil d'élution des différents oligomères par filtration sur gel (Superdex HR 16/60) de FUR d' <i>E.coli</i> après une première étape de purification par chromatographie d'affinité. Le pic annoté D correspond au pic de dimère (64,5 mL poids apparent de 35 kDa) et le pic M au pic de monomère (72 mL poids apparent de 22 kDa). Les fractions oligomères contiennent du FUR sous forme tétramère et plus. B) gel SDS-PAGE montrant que la protéine FUR obtenue à l'issue de la purification est pure.	- 106 -
Figure III.4 : Spectre HSQC ¹ H- ¹⁵ N du dimère Zn ₅ FUR _D avec l'attribution	- 107 -
Figure III.5 : Superposition des valeurs de déplacement chimique secondaire (delta = δ _{exp} - δ _{random coil}) obtenues pour les noyaux CO (barres vides) et Cα (barres pleines) du dimère. Plusieurs résidus successifs ayant un delta positif sont organisés en hélice α et plusieurs résidus successifs ayant un delta négatif sont organisés en brin β. La troisième hélice est l'hélice supposée de reconnaissance de l'ADN.	- 108 -
Figure III.6 : Bandes de spectre 3D ¹ H- ¹⁵ N-HSQC-NOESY-HSQC extraites des couples (¹ H, ¹⁵ N) et alignées selon la séquence de la protéine. Ce type de représentation permet de confirmer l'attribution par l'observation des NOEs i, i-1 et i+1 entre les protons amides. La proline n'est pas observable du fait de l'absence de proton amide dans ce résidu.	- 110 -
Figure III.7 : Récapitulatif des informations obtenues par RMN sur Zn ₅ FUR _D d' <i>E.coli</i> . Les dH _N H _N correspondent aux NOEs observés entre protons amide. Le CSI correspond au consensus de l'index des déplacements chimiques secondaires (delta) des CO et Cα obtenu à partir du programme écrit par Wishart et <i>al.</i> Une valeur de 1 indique la présence d'une hélice et une valeur de -1 révèle la présence d'un feuillet.	- 111 -
Figure III.8 : Association des brins β du dimère de apo FUR déduite à partir de l'étude des NOEs entre groupements amides. Les brins β5 et β5' forment un feuillet β antiparallèle inter sous-unité. Les chaînes latérales ont été omises par souci de clarté.	- 112 -
Figure III.9 : HSQC ¹ H- ¹⁵ N enregistrée à 600 MHz de l'échantillon deutéré à 50 % en milieu isotrope (spectre de gauche) et anisotrope (C ₁₂ E ₆ /hexanol 5 % r=0,64 ; spectre de droite). Tampon MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7.5. On peut remarquer l'augmentation de la largeur de raie dans la dimension ¹ H qui passe de ~35 Hz en milieu isotrope à ~40 Hz dans le milieu anisotrope. On note également la diminution d'intensité d'un certain	

- nombre de résonances. Les deux expériences ont été enregistrées avec les mêmes paramètres : nombre de scans =8, nombre d'incrément dans la dimension indirecte=128. Echantillons à 2.2mM. - 114 -
- Figure III.10 : Plans ^1H , ^{13}C (résidu G146) des différents spectres 3D utilisés pour la mesure des couplages dipolaires résiduels à partir de l'échantillon triplement marqué et ~50% deutéré dans le milieu C_{12}E_6 /hexanol 5% $r=0,64$ - 115 -
- Figure III.11 : Analyse des couplages dipolaires résiduels par le programme MODULE v2 (7). Seuls les résidus des régions structurées ont été pris en compte. - 116 -
- Figure III.12 : Analyse des couplages dipolaires résiduels par le programme MODULE (7). Les résidus des régions structurées du domaine N-terminal et du domaine C-terminal sont respectivement en noir et en gris. - 117 -
- Figure III.13 : Mesure du couplage dipolaire résiduel dans les expériences 2D. - 117 -
- Figure III.14 : Comparaison des pertes de signal en intensité de FUR dans les milieux orientés C_{12}E_6 (A) et C_{12}E_6 /CTAB (27 :1) (B). - 118 -
- Figure III.15 : Comparaison des couplages dipolaires résiduels mesurés entre ^1H et ^{15}N de la liaison amide dans quelques milieux testés. A) C_{12}E_6 / C_{12}E_6 ; B) C_{12}E_6 ,CTAB / C_{12}E_6 ; C) C_{12}E_6 ,CTAB / C_{12}E_5 ,CTAB. Lors des mesures, seuls les pics bien résolus sont pris en compte. - 119 -
- Figure III.16 : Alignement des séquences de FUR d'*E.coli* et de *P.aeruginosa* avec les structures secondaires identifiées par RMN pour FUR d'*E. coli*, cristallographie pour FUR de *P.aeruginosa* (22) et prédites sur le serveur JPred pour FUR d'*E. coli* (13). Les données RMN et cristallographiques sont très proches excepté pour les premiers résidus de la région N terminale où l'on observe la présence d'une hélice α dans la structure cristallographique absente dans la structure de l'apo dimère de FUR d'*E.coli*. Les résidus en gras sont impliqués dans la coordination des métaux dans les 2 sites métalliques et sont conservés dans les différents organismes. ♦ : résidus impliqués dans le site régulateur chez *P.aeruginosa* ; * : résidus impliqués dans le site structural chez *P.aeruginosa* ; Ψ : résidus impliqués dans le site structural chez *E.coli* (12) ; ? : résidus non attribués. - 121 -
- Figure III.17 : Alignement partiel (programmes BLAST puis CLUSTALW) des séquences de FUR de différents microorganismes. La numérotation correspond à celle de FUR d'*E. coli*. Les résidus en magenta sont impliqués dans la stabilisation du dimère par interaction hydrophobe. Les cystéines C terminales (92/95 et 132/137 chez *E. coli*) sont en rouge. Les résidus en bleu sont impliqués dans la coordination des métaux chez FUR de *P.aeruginosa*. - 124 -
- Figure III.18 : Quelques motifs de type hélice-coude-hélice ailé. A : FUR *P.aeruginosa* ; B : DtxR *C.diphtheriae* ; C : BirA *E.coli* et D : CAP *E.coli*. E : CueR *E.coli* et F : SmtB *Synechococcus PCC7942*. L'hélice en rouge correspond à l'hélice d'interaction avec l'ADN. Les motifs hélice-coude-hélice ailés sont formés de 2 hélices α , d'un feuillet β et d'une troisième hélice α qui stabilise l'interaction du motif H-T-H avec l'ADN (16). Tous ces motifs se distinguent par l'orientation relative et la position des hélices les unes par rapport aux autres. Le code couleur sert à visualiser les éléments de structures secondaires qui ont une position « équivalente » dans l'espace dans les différentes protéines (or, magenta, rouge, cyan). La dernière hélice est en orange ($\alpha 1$ FUR), rose (CueR) et verte (SmtB). - 126 -
- Figure IV.1 : Spectre de masse électrospray en conditions dénaturantes (acétonitrile 80%) du monomère de FUR enregistré sur un spectromètre électrospray-Quadripôle-TOF. La protéine à 50 μM a été injectée par nanospray. Tension d'ionisation : 1400 V, tension d'orifice : 120 V, température de l'interface : 80°C (issu de (5)). ... - 132 -
- Figure IV.2 : (A) Spectres de masse MALDI du monomère après digestion par la LysC. La protéine, à une concentration de 25 μM dans un tampon bicarbonate d'ammonium à 100 mM (pH=7,9), a été digérée par la LysC (1% w/w) pendant 6 heures. (B) Agrandissement de la zone m/z 2449 à 2479 (issu de (5)). - 133 -
- Figure IV.3 : Chromatogrammes de gel filtration du monomère en présence de DTT et de Zn^{2+} . Solution de monomère à une concentration de 1.9 mM dans un tampon Tris/HCl 0,1M, contenant 0,1M de KCl équilibré à pH = 8 puis (A) après l'ajout de 1 équivalent de Zn^{2+} , (B) 10 minutes et 1 heure après l'ajout de 4 équivalents de DTT, (C) 1 équivalent de Zn^{2+} ajouté 10 minutes après 4 équivalents de DTT, (D) 1 équivalent de Zn^{2+} ajouté 1 heure après 4 équivalents de DTT (issue de (5)). - 134 -

- Figure IV.4 : Le passage du monomère au dimère nécessite d'abord la réduction des cystéines puis l'incorporation de zinc. - 135 -
- Figure IV.5 : Courbes caractéristiques CD suivant la nature de ces éléments de structure secondaire (issue de *Brahms & Brahms, 1980*). - 135 -
- Figure IV.6 : A) Spectres de CD enregistrés dans l'UV lointain et normalisés par rapport à la concentration et au nombre de résidus du monomère oxydé, du monomère réduit par 20 équivalent de DTT, du monomère réduit en présence de 1 équivalent de Zn et du dimère. Tous les spectres ont été enregistrés dans du tampon MOPS 20 mM KCl 40 mM pH 7. Le blanc est soustrait de chaque courbe expérimentale. Les longueurs d'ondes caractéristiques des structures secondaires sont indiquées par des traits pointillés avec la structure secondaire correspondante avec « RC » pour « random coil ». B) Spectres de différence. Le CD montre que lors de la réduction, les structures secondaires du monomère restent identiques. Par contre, l'ajout de Zn^{2+} entraîne d'importants changements spectraux et l'on « retrouve » le spectre correspondant au dimère. Le spectre du dimère n'est pas totalement retrouvé car le passage monomère dimère n'est pas total du fait de l'excès de DTT qui peut complexer le Zn. Dans notre cas, on peut estimer que 70% du monomère a dimérisé. C) Superposition des courbes obtenues au cours des différents ajouts de Zn^{2+} - 136 -
- Figure IV.7 : Comparaison des spectres 1H - ^{15}N HSQC du dimère pur à 1,1 mM (A) et du monomère pur) à 1 mM (B). - 138 -
- Figure IV.8 : Spectre 2D 1H - ^{15}N HSQC de FUR monomère 1 mM oxydé (A en noir) et réduit par 20 équivalents de DTT (A en rouge) et du monomère réduit par 20 équivalents de DTT auquel 1,5 équivalents de Zn^{2+} ont été ajoutés (B). La réduction des cystéines n'entraîne pas d'importants changements conformationnels. Des changements sont visibles pour les résidus proches des cystéines. Les résidus indiqués en A) sont issus de l'attribution des résonances du monomère. L'ajout de Zn^{2+} sur le monomère réduit entraîne d'importants changements de structure comme on peut le voir sur le spectre B. On retrouve le spectre du dimère mais la dimérisation n'est pas totale du fait de la présence de DTT en excès qui complexe le Zn^{2+} . L'augmentation de la dispersion des résonances indique une augmentation de la structuration des sous-unités lors de la dimérisation avec notamment la formation de structures en feuillet β - 139 -
- Figure IV.9 : Superposition des spectres 1H - ^{15}N HSQC du dimère (en vert) et du monomère (en magenta). Les résonances attribuées correspondent uniquement aux résidus du domaine C terminal du dimère. La structuration intervenant lors de la dimérisation concerne très majoritairement les résidus du domaine C terminal de FUR. L'attribution de la région centrale n'est pas indiquée pour plus de clarté. - 140 -
- Figure IV.10 : Comparaison de la stabilité à 25°C du monomère de FUR à 1 mM dans MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7 en absence (A) ou en présence (B) d'EDTA 20 mM. - 141 -
- Figure IV.11 : Spectre HSQC 1H - ^{15}N du monomère avec l'attribution - 142 -
- Figure IV.12 : Superposition des valeurs des déplacements chimiques secondaires ($\Delta = \delta_{exp} - \delta_{random\ coil}$) obtenues pour les noyaux CO (barres vides) et C α (barres pleines) du monomère. Plusieurs résidus successifs ayant un delta positif sont organisés en hélice α et plusieurs résidus successifs ayant un delta négatif sont organisés en brin β - 143 -
- Figure IV.13 : Différences des valeurs des déplacements chimiques secondaires CO (barres vides) et C α (barres pleines) du monomère et du dimère ($\Delta_{\Delta} = \Delta_{monom\grave{e}re} - \Delta_{dim\grave{e}re}$). Les structures secondaires identifiées pour chaque formes sont représentées en haut pour le monomère et en bas pour le dimère. Les structures secondaires du domaine N-terminal sont globalement identiques dans les deux formes. La grande différence réside dans la présence d'une hélice α N-terminale (résidus 5 à 9) présente dans le monomère et absente dans le dimère. - 143 -
- Figure IV.14 : NOE 1H - ^{15}N enregistré à 600 MHz à l'équilibre du monomère (A) et du dimère (B). - 144 -
- Figure IV.15 : Modèle représentant les mécanismes hypothétiques impliqués lors de la dimérisation de *E.coli* FUR. - 146 -
- Figure V.1 : Schéma d'activation de FUR dimère. Le domaine de liaison à l'ADN est représenté en rouge, le domaine de dimérisation en cyan. Les cercles correspondent aux sites structuraux et les carrés arrondis aux sites régulateurs. - 152 -

- Figure V.2 : Spectre d'absorption de la protéine monomérique à une concentration de 120 μM dans un tampon Tris/HCl 0,1M, KCl 0,1M à pH = 8, reconstituée avec 1 équivalent de Co^{2+} (trait plein). Spectre d'une solution de CoSO_4 à une concentration 1 mM dissous dans un tampon Tris/HCl 0,1M, KCl 0,1M à pH = 8 (trait pointillé). (repris de la thèse de B. D'Autréaux (4)) - 153 -
- Figure V.3 : Spectre d'absorption de la protéine monomère CoFUR après réduction par le DTT (repris de la thèse de B. D'Autréaux (4)). La protéine monomère à une concentration de 120 μM dans un tampon Tris/HCl 0,1M, KCl 0,1M équilibré à pH = 8, a été reconstituée avec 1 équivalent de Co^{2+} . Les spectres ont été obtenus entre 0 et 50 minutes après réduction par 4 équivalents de DTT dans la cuve et sans agitation. - 153 -
- Figure V.4 : Spectre d'absorption électronique. (A) Monomère à une concentration de 56 μM dans un tampon BTP 0,1M, KCl 0,1M, pH = 7,5 + 1 éq de Fe^{2+} préparé en anaérobie. Spectre enregistré en anaérobie (trait pointillé), spectres enregistrés 2, 5, 10, 15, 22, 35 et 45 minutes après ouverture à l'air (traits pleins). (B) Comparaison des spectres de différence du monomère + Fe^{2+} entre 45 minutes et 2 minutes après ouverture à l'air et d'une solution de sel de Mohr ($\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) à 55 μM dans le tampon BTP 0,1M, KCl 0,1M à pH = 7,5 avant et après ouverture à l'air. (Repris de la thèse de B.D'Autréaux (4)) - 155 -
- Figure V.5 : Superposition des spectres obtenus à 0 et 0,5 équivalents de ZnSO_4 . L'intensité des signaux des résidus F79, E80, Q83, Q84, L121 et L128 semble diminuée plus vite que pour les autres résidus. Ceci suggère que ces résidus sont proches du site de liaison du métal. La présence du Zn^{2+} augmenterait la relaxation de ces résidus expliquant la diminution de l'intensité du signal. - 156 -
- Figure V.6 : Titration de 1,5 mM d'apo monomère dans MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7,5 par du ZnSO_4 20 mM de 0,25 à 0,75 équivalents. Monomère contrôle (A) ; monomère 0,25 équivalent ZnSO_4 (B) ; 0,5 équivalent ZnSO_4 (C) ; 0,75 équivalent ZnSO_4 (D). L'ajout de ZnSO_4 n'entraîne pas de changements spectraux importants. Par contre, une perte de signal est observée du fait de la précipitation métal-dépendante de la protéine (A-D). - 157 -
- Figure V.7 : A) Spectres de dichroïsme circulaire de 10 μM de monomère en présence de concentrations croissantes en Mn^{2+} (0 à 120 équivalents). B) Spectre de différence des spectres du monomère en présence de Mn^{2+} avec le spectre de l'apo monomère. - 158 -
- Figure V.8 : Titration de 1,1 mM de FUR dimère dans MOPS 100 mM KCl 500 mM par du ZnSO_4 20 mM de 0,5 à 2 équivalents de Zn^{2+} par sous-unité par pas de 0,5. Dimère contrôle (A) ; 0,5 eq ZnSO_4 (B) ; 1 eq ZnSO_4 (C) ; 1,5 eq ZnSO_4 (D). L'ajout de ZnSO_4 entraîne des changements spectraux importants traduisant une réorganisation structurale. L'ajout de ZnSO_4 entraîne également la précipitation de la protéine. Temps d'incubation après chaque addition de 15 minutes à 298 K. - 159 -
- Figure V.9 : Activation de 1 mM de FUR dimère (Zn_5FUR_D) dans MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7,5 par du zinc incorporé par dialyse dans le même tampon contenant 500 μM de ZnSO_4 . A) spectre 2D ^1H - ^{15}N HSQC 600 MHz de FUR dimère dialysé contre du tampon contenant 500 μM de zinc. Nombre de scans = 16, nombre d'incrémentes dans la dimension indirecte = 128 B) spectre 2D ^1H - ^{15}N HSQC à 600 MHz du précipité obtenu à l'issue de la dialyse et redissout dans le tampon MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7,5 contenant de l'EDTA 4 mM. Nombre de scans = 32, nombre d'incrémentes dans la dimension indirecte = 128. - 161 -
- Figure V.10 : A) Spectres de dichroïsme circulaire enregistrés sur des échantillons de 10 μM de Zn_5FUR_D dans MOPS 20 mM KCl 40 mM pH 7 à 298 K en présence d'une concentration croissante en MnSO_4 et normalisés par rapport à la concentration et au nombre de résidus. Les temps d'incubations des courbes représentées sont tous de une heure. B) Spectre de dichroïsme circulaire de Zn_5FUR_D dans MOPS 20 mM KCl 40 mM pH 7 à 298 K en absence de MnSO_4 enregistrés à différents temps. C) Spectre de différence entre les spectres obtenus en présence et en absence de métal. En absence de MnSO_4 , la protéine est stable dans le temps de l'expérience. - 162 -
- Figure VI.1 : Test de protection à la coupure par HinfI. - 168 -
- Figure VI.2 : Test d'activité de protection à la coupure par HinfI du monomère. Les réactions ont été réalisées en anaérobiose partielle (incubation de la protéine avec l'ADN et le métal en anaérobiose stricte mais incubation avec HinfI en aérobiose) avec 50 nM de plasmide pDT10 et la protéine monomère à des concentrations de 2 μM , 20 μM et 50 μM en absence et présence de 1 équivalent de Fe^{2+} . Le premier puit contient de la protéine FUR dimère à une concentration de 20 μM en présence de 1 équivalent de Fe^{2+} (issu de (3)). - 168 -

Figure VI.3 : Profil d'élution par chromatographie d'exclusion sur gel (Superdex 75 HR 10/30) d'une solution de 80 μM de monomère issu de la dernière étape de purification puis incubé 15 minutes en présence de 10 équivalents de Mn^{2+} (en noir). Profil d'élution d'une solution à 25 μM de monomère sélectionné après incubation avec 10 équivalents de Mn^{2+} (normalement incapable de dimériser) et réincubé avec 10 équivalents de Mn^{2+} (en rouge). Le monomère obtenu de cette façon est incapable de dimériser. L'absence d'un pic correspondant au volume d'élution du dimère montre que le monomère oxydé reste monomère en présence d'un excès de Mn^{2+} .	- 170 -
Figure VI.4 : Test d'activité de protection à la coupure par <i>HinfI</i> du monomère en présence de concentrations croissantes de Ni^{2+} . 50 nM de plasmide pDT10 ont été incubés avec 20 μM de monomère.	- 171 -
Figure VI.5 : Principe de l'anisotropie de fluorescence. PM : photomultiplicateur.	- 172 -
Figure VI.6 : Titration en anisotropie de fluorescence de 10 nM d'un oligomère de 25 paires de bases contenant la séquence consensus de liaison à l'ADN de FUR dans le tampon MOPS 20 mM KCl 150 mM pH 7 en présence de quantités croissantes de Zn_5FUR_D .	- 173 -
Figure VI.7 : Titration de 10 nM d'ADN consensus en présence d'une concentration fixe de monomère ou de dimère dans MOPS 20 mM KCl 125 mM poly-dIdC 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ MgSO_4 12 mM pH 7 par une concentration croissante de MnSO_4 . Le rapport Mn / FUR est exprimé par rapport à une sous-unité de FUR. Les courbes pointillées correspondent aux ajustements obtenus avec l'équation de Hill.	- 174 -
Figure VI.8 : Titration par anisotropie de fluorescence de 10 nM d'ADN consensus dans MOPS 20 mM KCl 125 mM poly-dIdC 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ MgSO_4 12 mM pH 7 par une concentration croissante de FUR dimère (A) ou monomère (B). Les cercles correspondent aux expériences réalisées en présence de 1 mM de MnSO_4 et les carrés correspondent aux expériences réalisées en absence de MnSO_4 . Les données sont ajustées avec l'équation de Hill (courbe pointillées) afin d'obtenir un K_d apparent. A) K_d apparent de 40 ± 1 nM B) K_d apparent de 102 ± 2 nM.	- 175 -
Figure VI.9 : Simulation du pourcentage de complexe FUR-Mn(II) pour un équilibre simple $A+B \rightarrow AB$ en absence de coopérativité et pour des sites identiques. A) Simulation pour une titration en présence de 1 mM de MnSO_4 (conditions de l'expérience Figure VI.8A). B) Titration par du MnSO_4 pour une concentration constante de 375 nM de Zn_1FUR_D (conditions de l'expérience Figure VI.7).	- 176 -
Figure VI.10 : Migration des différents marqueurs en fonction du pourcentage d'acrylamide.	- 178 -
Figure VI.11 : Détermination du poids moléculaire du complexe FUR_D/ADN . A) exemple de gel visualisé par fluorescence montrant la migration de l'ADN. B) Graphique représentant la variation de migration des espèces suivant le % d'acrylamide (pente) en fonction du poids moléculaire des espèces. Les marqueurs utilisés sont l' α -lactalbumine (αL), l'anhydrase carbonique (CA), l'albumine d'œuf (AE) et l'albumine bovine que l'on trouve sous forme monomère (AB_M) dimère (AB_D) et tétramère (AB_T). Les points \blacklozenge avec les barres d'erreurs correspondent aux valeurs de pentes obtenues pour les complexes FUR_D/ADN .	- 178 -
Figure VI.12 : Titration de 10 nM d'ADN consensus par des concentrations croissantes de FUR_{1-82} dans du tampon MOPS 20 mM KCl 125 mM MgSO_4 12 mM dIdC 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pH 7 en présence ou non de 1 mM de MgSO_4 1 mM.	- 181 -
Figure VI.13 : Test d'activité de protection à la coupure par <i>HinfI</i> de FUR_{1-82} .	- 182 -
Figure VI.14 : Spectre ^1H - ^{15}N HSQC enregistré à 600 MHz de FUR_{1-82} à 1.8 mM dans MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7.5 avec l'attribution déduite de l'attribution du monomère.	- 183 -
Figure VI.15 : Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC enregistrés à 600 MHz du monomère (noir) et de FUR_{1-82} (rouge).	- 184 -
Figure VI.16 : A gauche, structure du dimère de FUR_{1-82} obtenu par cristallographie. Les Cd^{2+} impliqués dans la stabilisation du dimère sont représentés en rouge. A droite, un cadmium est coordonné par les résidus H32 et E80, résidus impliqués dans la coordination du $\text{Zn}(\text{II})$ dans le site structural de FUR de <i>P.aeruginosa</i> .	- 186 -
Figure VI.17 : Comparaison des structures secondaires déterminées pour le monomère par RMN et pour FUR_{1-82} par cristallographie.	- 186 -

Figure VI.18 : Superposition des structures cristallographiques de FUR de *FUR₁₋₈₂* (bleue) et de *Pseudomonas aeruginosa* (magenta). Les chaînes principales sont représentées sous forme de ruban. - 187 -

Figure VII.1 : Modèle chimère constitué de la superposition de *FUR₁₋₈₂* (bleu et cyan) avec FUR de *P.aeruginosa* (le domaine N-terminal de celle-ci n'étant pas montré). Les domaines C-terminaux (rouge et vert correspondent à ceux de FUR de *P.aeruginosa*). Sous forme apo, les résidus non structurés de l'extrémité N-terminale pourraient être proches de la région centrale (positions 76 et 97) et du C-terminal de l'autre sous-unité. L'incorporation de métal entraînerait un changement conformationnel avec la rupture d'interactions stabilisant les résidus N-terminaux dans la région centrale. L'orientation de ces résidus serait alors modifiée, ils se structureraient en hélice α pour se positionner comme observé dans la figure (orientation identique dans *E.coli* et *P.aeruginosa*). La flèche en pointillé montre le mouvement supposé des résidus N-terminaux (marrons) lors de l'activation de la protéine par le métal. - 197 -

Figure VII.2 : Modèle de $Zn_RZn_SFUR_D$ de FUR d'*E.coli* réalisé avec Swiss-model à partir de la structure cristallographique de $Zn_RZn_SFUR_D$ de *P.aeruginosa*. Les Zn(II) (sphères rouge et violette) correspondent aux Zn(II) observés dans la structure cristallographique de FUR de *P.aeruginosa*. - 200 -

Figure VIII.1 : Site de coupure pour la nucléase *HinfI* dans le promoteur aérobactine. La zone de fixation correspond à la zone de fixation principale identifiée par empreinte à la DNase I. Les positions -10 et -35 délimitent la zone reconnue par l'ARN polymérase. Les encadrés en traits discontinus délimitent les « Iron Boxes »... - 214 -

Figure VIII.2 : Site de coupure pour la nucléase *HinfI* dans le promoteur aérobactine. La zone de fixation correspond à la zone de fixation principale identifiée par empreinte à la DNase I. Les positions -10 et -35 délimitent la zone reconnue par l'ARN polymérase. Les encadrés en traits discontinus délimitent les « Iron Boxes ». L'insert contenant la boîte aérobactine a été introduit entre les sites BamHI et HindIII. La figure indique A indique également tous les sites de restrictions *HinfI*. L'utilisation de l'enzyme *HinfI* en présence ou en absence de liaison de FUR conduit aux profils de digestion observés en B. Les plus petits fragments ne sont pas observables car ils sortent du gel pendant la migration. - 214 -

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Les différentes familles de métallo-régulateurs chez les bactéries avec quelques exemples.	- 21 -
Tableau I.2 : Résumé des caractéristiques des différents régulateurs de la famille SmtB/ArsR.	- 23 -
Tableau I.3 : Quelques membres de régulateurs de la famille MerR.	- 29 -
Tableau I.4 : Exemples de régulateurs de la famille DtxR.	- 34 -
Tableau I.5 : Exemples de régulateurs de la famille FUR.	- 39 -
Tableau I.6 : Les différents métallo-régulateurs, leur forme active et leur propriété d'interaction avec l'ADN en fonction de leur état de métallation.	- 53 -
Tableau II.1 : Expériences enregistrées pour l'attribution classique de la chaîne principale.	- 75 -
Tableau II.2 : Tableau résumant les interactions NOEs caractéristiques observables dans les structures secondaires. L'épaisseur des traits reflète l'intensité des pics.	- 80 -
Tableau III.1 : Composition en acides aminés d' <i>E.coli</i> FUR.	- 103 -
Tableau III.2 : Les différents marquages réalisés pour l'étude par RMN d' <i>E.coli</i> FUR.	- 106 -
Tableau III.3 : Résidus contenant des méthyles.	- 109 -
Tableau III.4 : Tableau donnant les distances mesurées dans la structure cristallographique comparées aux NOEs longues distances observés. Les deux sous-unités du dimère sont désignées A et B.	- 122 -
Tableau IV.1 : Masses des peptides issus de la digestion de la protéine FUR monomère par LysC, obtenues par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les masses attendues sont celles correspondant à une protéine FUR non modifiée.	- 133 -
Tableau V.1 : Tableau récapitulatif des observations réalisées lors de la titration de Zn ₅ FUR _D par du ZnSO ₄ suivie par RMN.	- 159 -
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des paramètres déterminés lors de l'ajustement par l'équation de Hill.	- 176 -
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des paramètres cristallographiques et de la qualité de la structure.	- 185 -
Tableau VIII.1 : Composition du milieu M9.	- 209 -
Tableau VIII.2 : Composition de la solution de vitamines.	- 209 -
Tableau VIII.3: Paramètres d'acquisitions des expériences 3D utilisées pour l'attribution de la chaîne principale du dimère.	- 221 -
Tableau VIII.4 : Paramètres d'acquisitions des expériences 3D utilisées pour l'attribution des chaînes latérales. -	221 -
Tableau VIII.5 : Paramètres d'acquisitions des expériences 3D utilisées pour l'attribution des NOEs entre protons amides et des NOEs entre méthyles.	- 222 -
Tableau VIII.6 : Paramètres d'acquisitions des expériences 2D utilisées pour la mesure des NOEs hétéronucléaires. -	223 -

Tableau VIII.7 : Paramètres d'acquisitions des expériences 3D utilisées pour la mesure des couplages dipolaires résiduels.	- 224 -
Tableau VIII.8 : Paramètres d'acquisitions des expériences 3D utilisées pour l'attribution de la chaîne principale du dimère.	- 224 -

Chapitre I

Les métallo-régulateurs transcriptionnels dans les organismes procaryotes

Les ions métalliques sont indispensables au bon fonctionnement cellulaire car ils participent à de nombreux processus tels que la biosynthèse de l'ADN, la respiration (72)... Ils sont soit directement impliqués dans les réactions enzymatiques, soit indispensables à la bonne structuration de la protéine qui les contient. (73, 94).

Certains ions métalliques sont essentiels à la cellule, d'autres sont toxiques pour la cellule, mais dans les deux cas, il y a un seuil de concentration au-delà duquel l'ion devient toxique. Il est donc nécessaire de réguler finement l'homéostasie de tous les ions métalliques. A cette fin, la cellule a développé des systèmes complexes employant une variété de mécanismes (incorporation, export, stockage) qui permettent d'éliminer ces toxines. Chez les procaryotes, le contrôle de ces systèmes de protection se fait au niveau transcriptionnel par l'intermédiaire de protéines dont la fonction est de détecter, de manière spécifique *in vivo* les métaux libres en les chélatant.

I.1 Plusieurs familles de métallos-régulateurs pour le contrôle de l'homéostasie de métaux

Ces systèmes de régulation sont en général organisés sous forme d'opéron (*mer*, *ars*, *fep*) codant pour des transporteurs membranaires, des métal-réductases, des transporteurs cytoplasmiques ou périsplasmiques ou des protéines de stockage. Ils codent également au moins un régulateur transcriptionnel *trans* pour l'opéron.

Ces régulateurs transcriptionnels peuvent avoir le rôle soit d'**activateur** soit de **répresseur** de l'expression génique soit les deux.

Cinq familles de métallos-régulateurs (dénommées par le premier de ses représentants caractérisé) ont été identifiées à partir des analyses de séquences et sont listées dans le Tableau I.1 :

Famille	Régulateurs	Ion métallique physiologique	Fonction	Référence(s)
SmtB/ArsR	SmtB	Zn(II)	Homéostasie du Zn(II)	(41, 68, 109, 110)
	ArsR	As(III), Sb(III)	Résistance au As(III)	(100, 117)
	CzrA	Zn(II)	Homéostasie du Zn(II)	(40)
MerR	MerR	Hg(II)	Résistance au Hg(II)	(40)
	CueR	Cu(I), Ag(I), Cd(II)	Résistance au Cu(I)	(82, 105, 106)
	ZntR	Zn(II)	Homéostasie du Zn(II)	(15, 69, 81)
DtxR	DtxR	Fe(II)	Homéostasie du Fe(II)	(49)
	MntR	Mn(II)	Homéostasie du Mn(II)	(97)
FUR	FUR	Fe(II)	Homéostasie du Fe(II)	(42)
	ZUR	Zn(II)	Homéostasie du Zn(II)	(52, 85)
NikR	NikR	Ni(II)	Homéostasie du Ni(II)	(38)

Tableau I.1 : Les différentes familles de métallos-régulateurs chez les bactéries avec quelques exemples.

Il existe au moins une structure cristallographique pour chacune de ces familles.

L'ensemble de ces familles fonctionne-t-il sur des principes communs ? Les propriétés de Fur, la protéine qui nous intéresse, sont-elles comparables ou différentes de celles des autres familles ? Y a-t-il un lien entre le caractère essentiel ou toxique d'un ion métallique donné et le mode de fonctionnement des métallo-régulateurs contrôlant leur homéostasie ?

Sans vouloir faire une description exhaustive de l'ensemble des métallo-régulateurs, nous allons essayer de décrire les grands traits caractéristiques de chacune de ces familles. Les structures présentées dans cette introduction ont été réalisées à partir des fichiers de coordonnées extraits de la Protein DataBank (PDB) retravaillés à l'aide du logiciel Chimera (87). Des revues très récentes décrivent aussi les différents types de familles (48, 75, 86). Il sera particulièrement intéressant de voir comment l'ion métallique entraîne un changement conformationnel local. Et comment celui-ci se répercute au niveau du domaine de liaison à l'ADN pour entraîner le contrôle de l'expression des gènes.

1.2 La famille des régulateurs SmtB/ArsR

Cette famille a vu le jour lors de la découverte des protéines ArsR de *Escherichia coli* (101) et de SmtB de *Synechococcus PCC 7942* (117) dans les années 1990. Dans cette famille de régulateurs, la forme **apo** du régulateur se lie à l'ADN. La fixation de l'ion métallique entraîne un changement conformationnel déstabilisant le complexe ADN/protéine et permettant la transcription des gènes.

Le gène *smtB* de *Synechococcus PCC 7942* code pour un répresseur transcriptionnel jouant un rôle dans l'homéostasie du Zn(II). En absence de métal, la protéine SmtB réprime le gène *smtA* codant pour une métallothionéine de classe II (SmtA) impliquée dans la séquestration du Zn(II) en excès (76). Lorsque SmtB lie le Zn(II), la protéine se décroche de l'ADN permettant l'expression du gène codant pour SmtA. Bien que le Zn(II) soit reconnu pour être le cofacteur privilégié (24), la littérature montre que SmtB reconnaît également le Co(II) et le Cd(II) dans certaines conditions *in vivo* (65) et *in vitro* (109). ArsR est un répresseur reconnaissant l'arsenite et l'antimoine et contrôle l'opéron *ars* régulant l'expression d'une arsenate réductase et de protéines impliquées dans l'import/export de l'arsenate (20, 101, 117).

D'après des études de phylogénie, les membres de cette famille dérivent tous d'un ancêtre commun. Chaque membre a ensuite évolué pour détecter des ions métalliques de rayons différents avec des géométries de coordination différentes.

Les caractéristiques des différents membres de cette famille sont décrites dans le Tableau I.2 : spécificité ionique, type de site métallique, constante d'affinité pour les métaux...

Répresseur	Protéine régulée (fonction)	Activateurs possibles <i>in vivo</i>	Site(s) métallique(s)	Site de régulation	Référence(s)
SmtB	SmtA (Métallothionéine)	Zn(II) Co(II) Cd(II)	$\alpha 3N$, $\alpha 5$	$\alpha 5$	(41, 68, 109, 110)
AsrR	ArsA (ATPase d'export) ArsB (Transporteur à diffusion) ArsC (arsenate réductase)	As(III) Sb(III)	$\alpha 3$	$\alpha 3$	(100, 117)
CzrA	CzrB (transporteur à diffusion)	Zn(II) Co(II)	$\alpha 5$	$\alpha 5$	(40)
CadC	CadA (ATPase d'export)	Cd(II) Pb(II) Bi(II) Zn(II)	$\alpha 3N$, $\alpha 5$	$\alpha 3N$	(19, 21)
NmtR	NmtA (ATPase d'export)	Ni(II) Co(II)	$\alpha 5C$	$\alpha 5C$	(24)
ZiaR	ZiaA (transporteur à diffusion)	Zn(II)	$\alpha 3N$, $\alpha 5$	$\alpha 5$ et $\alpha 3N$?	(108)

Tableau I.2 : Résumé des caractéristiques des différents régulateurs de la famille SmtB/ArsR.

Cette famille de régulateurs contrôle essentiellement des gènes codant pour des protéines servant à diminuer la toxicité d'ions métalliques soit en les séquestrant, soit en les exportant, soit en les transformant en des formes moins toxiques. Les affinités pour les métaux des membres de cette famille de régulateurs sont toutes de l'ordre de 10^8 à 10^{12} M.

I.2.1 Caractéristiques structurales des régulateurs de la famille SmtB/ArsR

La structure cristallographique de apo-SmtB de *Synechococcus* PCC 7942 (2,2 et 1,7 Å de résolution) (31, 40) a montré qu'il s'agit d'un homodimère comportant un axe de symétrie (Figure I.1).

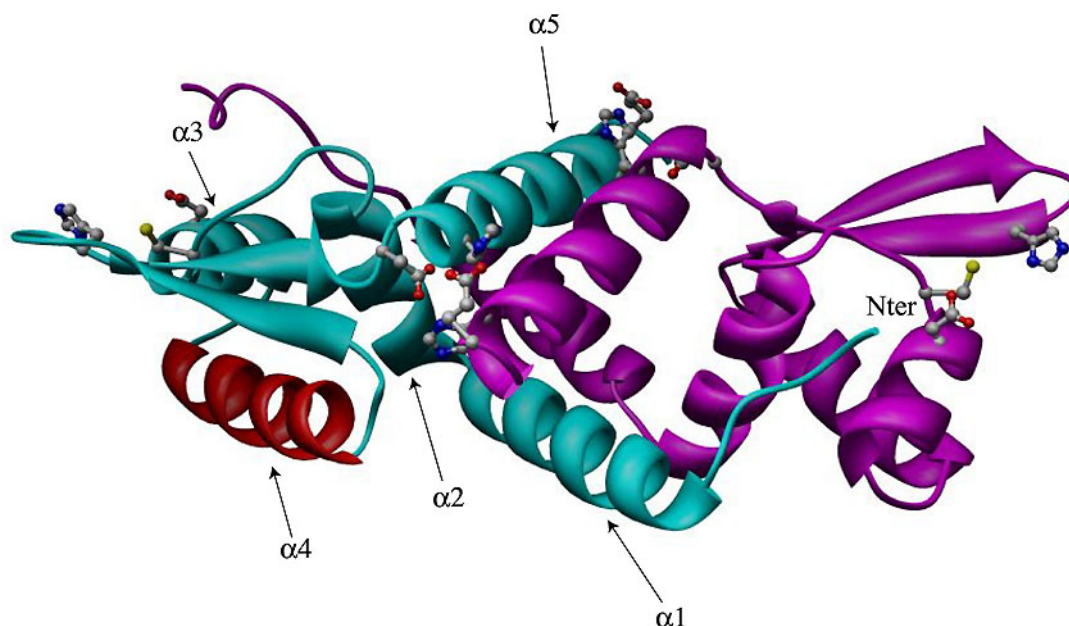


Figure I.1 : Représentation en ruban de la structure cristallographique de apo-SmtB. L'interface de dimérisation est composée des hélices $\alpha 1$ et $\alpha 5$ de chaque sous unité. L'hélice de reconnaissance de l'ADN (en rouge) est constituée de l'hélice $\alpha 4$.

Chaque sous unité contient 5 hélices α et 2 brins β avec une organisation de type $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 4$ - $\alpha 5$. L'interface de dimérisation est composée des hélices $\alpha 1$ N-terminale et $\alpha 5$ C-terminale de chaque sous-unité. L'hélice $\alpha 4$ est l'hélice de reconnaissance de l'ADN. Le domaine de liaison à l'ADN est de type hélice-coude-hélice ailé (winged-HTH motif) et est, comme nous le verrons par la suite, très semblable à celui de DtxR (répresseur à Fe(II) de la toxine diphtérique) (90) et à celui de FUR. La structure cristallographique n'a pas permis d'observer les 20 premiers résidus indiquant ainsi qu'il s'agit de résidus non ordonnés (Figure I.1).

Les données cristallographiques ont également été confirmées par la détermination par RMN des structures secondaires de apo-CzrA. Celles-ci sont exactement comme prévues par alignement de séquences (20). Vu le haut degré d'identité des membres de cette famille (25-50%), des modèles d'ArsR, de CadC et de NmtR ont été créés à partir de la structure cristallographique de SmtB.

SmtB existe en solution en équilibre entre des formes monomère et dimère ($K_{d\ M/D}$ **3 μ M**) mais aussi un peu de tétramère ($K_{d\ D/T}$ **de 1 mM**). Le Zn(II) déplace d'un facteur 100 environ l'équilibre en faveur du dimère. Ceci n'est pas étonnant puisqu'il est positionné à l'interface des deux sous-unités (68).

1.2.2 Sites métalliques et activation

Deux types de sites métalliques ont été identifiés dans la famille des régulateurs SmtB/ArsR : un type de site nommé $\alpha 3N$ et un type de site nommé $\alpha 5$. Le site $\alpha 3N$ contient trois ou quatre ligands cystéines, dont 2 au moins proviennent du motif très conservé ELCVCD de l'hélice $\alpha 3$, et un du domaine Nter. Le site $\alpha 5$ est un site inter sous-unité contenant 4 ligands provenant exclusivement de l'hélice $\alpha 5$. Certains membres de la famille possèdent des variantes de ces sites comme ArsR qui possède un site $\alpha 3$ et non $\alpha 3N$ (pas de ligand provenant de l'extrémité N terminale) et NmtR qui possède un site $\alpha 5C$ (1 ou 2 ligands provenant de l'extrémité C terminale après l'hélice $\alpha 5$).

Les deux types de sites peuvent être présents ou non suivant les régulateurs. Certains membres ne possèdent que le site $\alpha 3$ (pas de ligand provenant de l'extrémité N terminale) (*Listeria monocytogenes* CadC, ArsR), d'autres ne possèdent que le site $\alpha 5/\alpha 5C$ (1 ou 2 ligands provenant de l'extrémité C terminale après l'hélice $\alpha 5$) (CzrA, NmtR). Enfin, certains membres possèdent les 2 (SmtB, la plupart des CadC, ZiaR) (Tableau I.2). Dans ce cas, le rôle du deuxième site n'est pas élucidé puisqu'il apparaît qu'un seul site est nécessaire à l'activité de la protéine (21, 109, 116).

Nous allons plus particulièrement nous intéresser au cas de SmtB puisque des structures cristallographiques des formes apo et d'un triple mutant actif métallé ont été obtenues.

Deux sites métalliques ont été identifiés dans SmtB de *Synechococcus* PCC 7942 et sont localisés sur la Figure I.2 :

- Un premier site de type $\alpha 3N$ comprenant les résidus Cys61 et Asp64 de l'hélice $\alpha 3$, His97 du brin $\beta 2$ et un autre ligand.
- Un second site de type $\alpha 5$ comprenant les résidus Asp104 et His106 d'une sous-unité et les résidus His117' et Glu120' d'une autre sous-unité.

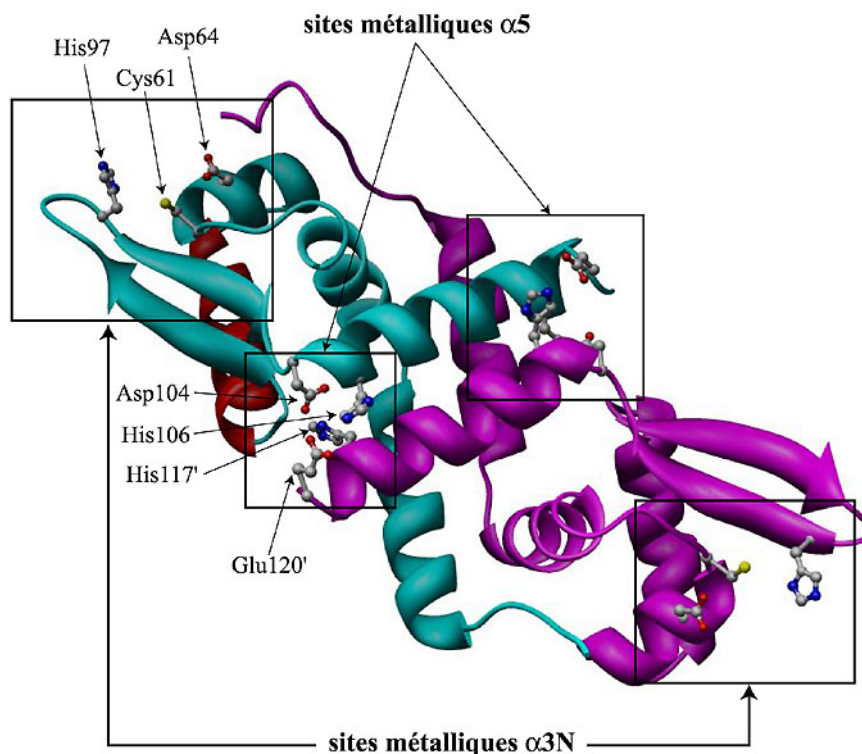


Figure I.2 : Localisation des sites métalliques de SmtB. *Synechococcus* PCC 7942

Il semble que ce soit le type d'acide aminé (Cys, His, Asp ou Glu) et le nombre de ligand dans les sites de types $\alpha 3/\alpha 3N$ et $\alpha 5/\alpha 5C$ qui déterminent la spécificité ionique et le site de régulation.

La structure d'une forme métallée contenant 2 ions $Zn(II)$ ($\alpha 5$ -SmtB 2 $Zn(II)$) a été résolue par cristallographie des rayons X à partir d'un triple mutant C14S, C61S et C121S. Du fait de ces mutations, le site $\alpha 3N$ n'existe plus contrairement au site $\alpha 5$ qui conserve sa forte affinité pour le métal. Comme pour la protéine sauvage, la liaison à l'ADN de ce mutant est inhibée par la fixation du métal (110). La comparaison des structures des formes apo-SmtB et du mutant $\alpha 5$ -SmtB 2 $Zn(II)$ indique que les changements de structures sont uniquement de nature quaternaire (Figure I.3) (40). En effet, une sous-unité de la forme apo peut être superposée sur une sous-unité de l'holoprotéine. L'activation peut donc être décrite par des mouvements de rotation/translation de corps rigide d'une sous-unité par rapport à l'autre. L'activation ne peut se faire que si les deux sites $\alpha 5$ sont liés à du $Zn(II)$ (40).

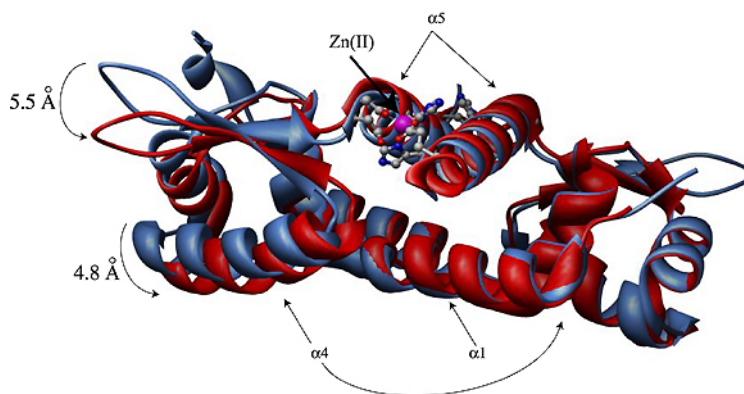


Figure I.3 : Superposition des structures de apo-SmtB (bleue) et du triple mutant [C14S, C61S, C121S] $\alpha 5$ -SmtB 2 Zn(II) (rouge) par rapport à une sous-unité de l'apo protéine. Lors de l'activation de la protéine par 2 ions de Zn(II), seuls des changements quaternaires interviennent correspondant à des mouvements de rotation/translation de corps rigide d'une sous-unité par rapport à l'autre (40). On voit bien les mouvements importants de l'hélice $\alpha 4$ et de la boucle reliant les brins β_1 et β_2 .

Cependant, ce mécanisme n'a pas pu être confirmé pour CzrA. En effet, bien que des cristaux de la forme apo ou liée à 2 Zn(II) aient pu être obtenus (40), la superposition d'une sous-unité de la forme apo avec une autre sous-unité de la forme CzrA 2 Zn(II) montre que les 2 formes sont très semblables (Figure I.4A). Les mouvements de type quaternaire sont bien plus faibles que pour SmtB. Les auteurs pensent que ceci est peut être du aux particularités du cristal.

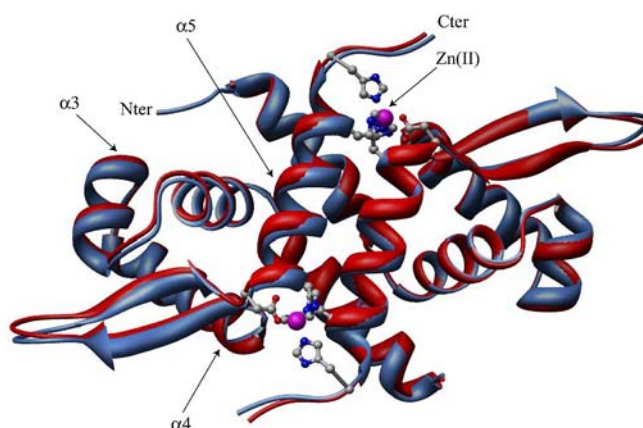


Figure I.4 : Superposition des structures de apo-CzrA (bleue) et Zn(II)-CzrA (rouge). La liaison du métal n'engendre pas de changement conformationnel majeur.

La comparaison des vitesses d'échanges H/D par RMN des formes apo et holo de CzrA permet clairement de se rendre compte que la liaison du métal diminue la flexibilité de l'holoprotéine par rapport à sa forme apo (40). Cette diminution de flexibilité pourrait être la cause de la baisse de l'affinité de CzrA pour l'ADN et donc expliquer son décrochage de ce dernier.

Cette étude RMN a aussi permis de proposer un mécanisme d'action sur le rôle de l'ion métallique en mettant en évidence la présence d'un réseau de liaisons hydrogènes dans la structure de SmtB permettant de mettre en relation les résidus impliqués dans la coordination du métal et le domaine de liaison à l'ADN (40). Dans ce mécanisme, le métal permet d'orienter convenablement la chaîne latérale de l'His 117 permettant de mettre en place le réseau de liaisons hydrogène. On a donc un effet à distance médié par des liaisons hydrogènes.

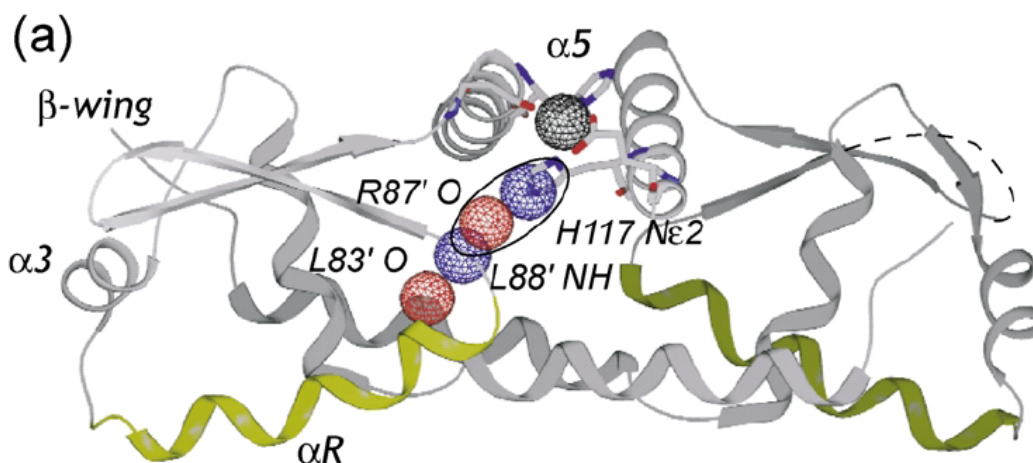


Figure I.5 : Réseau de liaison hydrogène intervenant dans la régulation de l'activité de SmtB. Le réseau de liaison hydrogène prend son origine avec l'azote de l'histidine 117 Nε2 n'intervenant pas dans la liaison du métal et se poursuit jusqu'à la Leu88 proche de l'hélice de reconnaissance pour l'ADN (40). Les sphères indiquent les atomes impliqués dans le réseau.

I.2.3 Interaction protéine / ADN

Comme de nombreux métallos-régulateurs (DtxR, FUR, NikR...), la séquence reconnue par les membres de la famille SmtB/ArsR est constituée d'un motif palindromique (motif 12-2-12 inversé) imparfait (ex Figure I.6).



Figure I.6 : Exemple de motifs 12-2-12 d'un promoteur reconnu par SmtB de type S1/S2 (20).

Du fait de la symétrie d'ordre 2 de la séquence promotrice et de SmtB, l'hypothèse était qu'un seul dimère se fixait sur un motif 12-2-12. Néanmoins, des calculs de modélisation ont indiqué qu'il faudrait un changement conformationnel (courbure, désenroulement) important de l'ADN pour que les hélices de reconnaissance de SmtB puissent interagir avec 2 grands sillons successifs de l'ADN (31).

Il n'y a pas encore de structure de complexe avec l'ADN décrite et le mode de fixation à l'ADN pour les membres de la famille SmtB/ArsR n'est pas complètement élucidé. Les résultats obtenus

montrent qu'un à quatre dimères peuvent se fixer sur l'ADN en fonction de la longueur de la séquence d'ADN et de la force ionique (20, 21, 68, 109).

1.3 La famille des régulateurs MerR

Cette famille est composée de régulateurs transcriptionnels homodimériques dont la particularité est d'être liés à l'ADN en absence ou en présence de leur cofacteur et de passer de la répression à l'activation de la transcription. Ce ne sont pas tous des métallos-régulateurs mais tous répondent à des stimuli environnementaux tels que le stress oxydant, les métaux ou encore les antibiotiques (Tableau I.3). Dans le cas des métallos-régulateurs (MerR, CueR et ZntR) la forme métallée entraîne une activation par torsion de l'ADN permettant une mise en phase des positions -35 et -10 de la région promotrice pour la fixation de l'ARN polymérase.

Répresseur	Protéine dont l'expression est régulée (fonction)	Activateur(s)	Référence(s)
MerR	Opéron mer (résistance au mercure)	Hg(II)	(8, 107)
SoxR	SoxS (régulateur)	(Fe(III)) ₂ , Stress oxydatif	(6, 51, 63)
BmrR	Bmr (résistance multi-drogue)	Différentes drogues	(4, 62)
Mta	Blr (résistance multi-drogue)	Différentes drogues	(3, 4)
CueR	CopA(transporteur), cueO (Cu-oxidase)	Cu(I), Ag(I), Au(I)	(82, 105, 106)
ZntR	ZntA (transporteur)	(Zn(II)) ₂ , Cd(II), Pb(II)	(15, 69, 81)

Tableau I.3 : Quelques membres de régulateurs de la famille MerR.

1.3.1 Caractéristiques structurales des régulateurs transcriptionnels de la famille MerR

Bien que MerR ait été le premier membre décrit de cette famille à la fin des années 1980 (79) sa structure n'est pas encore déterminée contrairement à celle d'autres membres : BmrR (la première déterminée, (62)), un mutant de Mta (MtaN, (62, 78)), CueR (25) et ZntR (25).

Les structures sont composées de 3 domaines (Figure I.7) :

- un domaine de liaison à l'ADN contenant un motif hélice-coude-hélice ailé (résidus 1 à 75) : où l'on trouve une forte homologie entre les différents membres de la famille.

- un domaine de jonction constitué de deux hélices antiparallèles de longueur variable entourées l'une autour de l'autre (« coiled-coil ») permettant la dimérisation.
- un domaine de d'activation qui peut être petit et ne contenir qu'un site métallique (CueR ou MerR) ou bien être beaucoup plus gros et constitué le site de fixation d'une drogue (BmrR).

La spécificité ionique semble être réalisée au niveau des ligands du site métallique qui, suivant leur nombre, permettent de discriminer entre les ions 1+ et 2+, ces derniers préférant un nombre de coordination plus élevé (25).

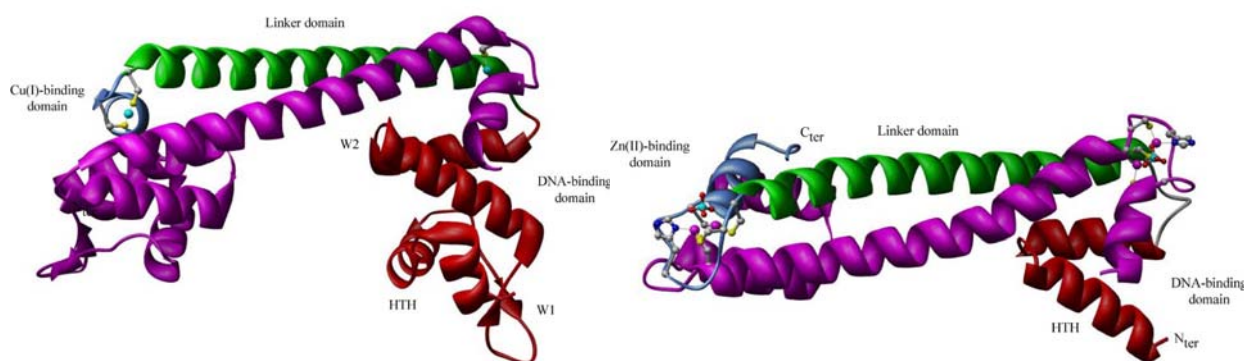


Figure I.7 : Structure tridimensionnelle obtenue par diffraction des rayons X de deux membres de la famille MerR : Cu(I)-CueR (à gauche, (25)) et de Zn(II)-ZntR (à droite, (25)). Les protéines de la famille MerR possèdent 3 domaines : un domaine de liaison à l'ADN (en rouge) de type hélice-coude-hélice ailé comportant une première aile W1 et une seconde aile W2 ; un domaine de jonction (en vert) permettant la dimérisation par la formation d'un coiled-coil de longueur variable ; un domaine d'activation (en bleu).

Le domaine de liaison à l'ADN, encore une fois, est du type hélice-coude-hélice ailé, mais avec un repliement différent : $(\beta_1)-\alpha_1-\alpha_2-\beta_2-\beta_3-\alpha_3-\alpha_4$, β_1 n'étant pas présent chez CueR et ZntR. Les hélices α_1 et α_2 , ainsi que le coude les reliant, forment le motif hélice-coude-hélice qui permet l'interaction avec l'ADN au niveau du grand sillon ; α_2 est l'hélice de reconnaissance. Cette interaction est renforcée par une première aile « W1 » formée des brins β_2 et β_3 , qui intervient notamment dans de nombreuses liaisons hydrogènes avec l'ADN. Certains des résidus formant des liaisons hydrogènes avec l'ADN sont conservés par tous les membres de la famille MerR (Arg 44 et Glu ou Asp ou Gln en position 28 en se référant à la numérotation de MerR).

L'originalité de l'interaction avec l'ADN des protéines de la famille MerR réside dans la présence d'une seconde aile « W2 ». Il ne s'agit pas d'une vraie aile mais d'un motif hélice-coude-hélice simple formé des hélices α_3 , α_4 et du coude les reliant. W2 forme des liaisons hydrogènes supplémentaires avec l'ADN au niveau du petit sillon (Figure I.8).

1.3.2 Mécanisme d'activation

Les structures cristallographiques des complexes ADN/BmrR/TPP à 2.4 Å (TPP : tetraphenylphosphonium ; activateur) à 2.4 Å et ADN/MtaN à 2.7 Å (mutant constitutivement actif de Mta) ont permis de confirmer le mécanisme d'activation (78) (Figure I.8). Comme expliqué plus haut, les régulateurs de la famille MerR régulent des gènes pour lesquels l'écart entre les régions promotrices -35 et -10 n'est pas optimum. Les séquences d'ADN reconnues par BmrR et Mta sont différentes mais possèdent 8 bases identiques sur 19. La superposition de ces bases identiques a permis de conclure que la structure de l'ADN dans les 2 complexes est très proche avec une déviation standard de 1,38 Å sur l'ensemble des atomes du squelette (78). Ceci suggère que les membres de la famille MerR ont un mode d'activation similaire qui implique une distorsion localisée de l'ADN permettant de réorienter les régions -10 et -35 du promoteur afin de les mettre en phase et de permettre la fixation de l'ARN polymérase (Figure I.9)

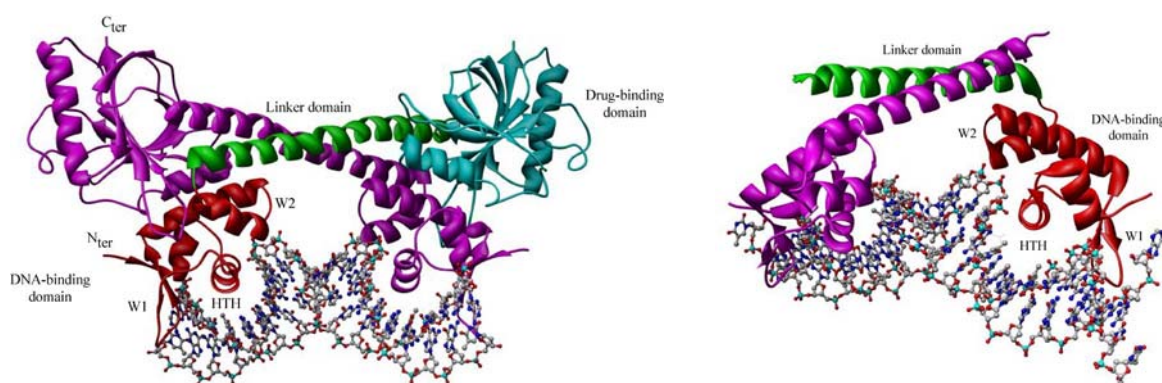


Figure I.8 : Structure tridimensionnelle obtenue par diffraction des rayons X des complexes ADN/protéine : BmrR (à gauche, (62)) et MtaN (à droite, (78)). Domaine de liaison à l'ADN (en rouge) ; domaine de jonction (en vert) ; domaine d'activation (en bleu).

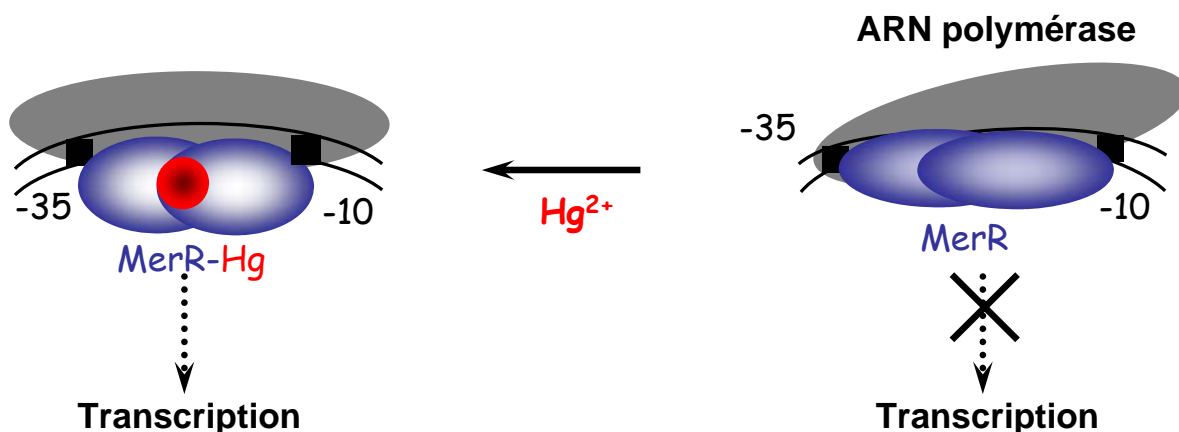


Figure I.9 : Schéma d'action de MerR. (issu de (16)). A) En absence de métal, les régions -35 et -10 du promoteur ne sont pas en phase empêchant ainsi l'ARN polymérase de transcrire le ou les gènes sous le contrôle du promoteur. B) En présence de Hg(II), MerR change de conformation en imposant à l'ADN une torsion permettant de mettre en phase les régions -35 et -10. Dans ces conditions, l'ARN polymérase peut commencer la transcription.

Dans cette famille de régulateurs, l'activation entraîne une rotation des domaines de liaison à l'ADN autour de l'axe formé par les longues hélices de jonction par l'intermédiaire d'une charnière « hinge » (rotation de 11° et une translation de 6 \AA du domaine de liaison à l'ADN pour MtaN-DNA/MtaN) (78) (Figure I.10). Cette rotation entraîne une torsion de l'ADN qui permet de mettre en phase les régions -35 et -10 du promoteur et la fixation de l'ARN polymérase. Ce mécanisme très élégant est différent de celui proposé pour FUR.

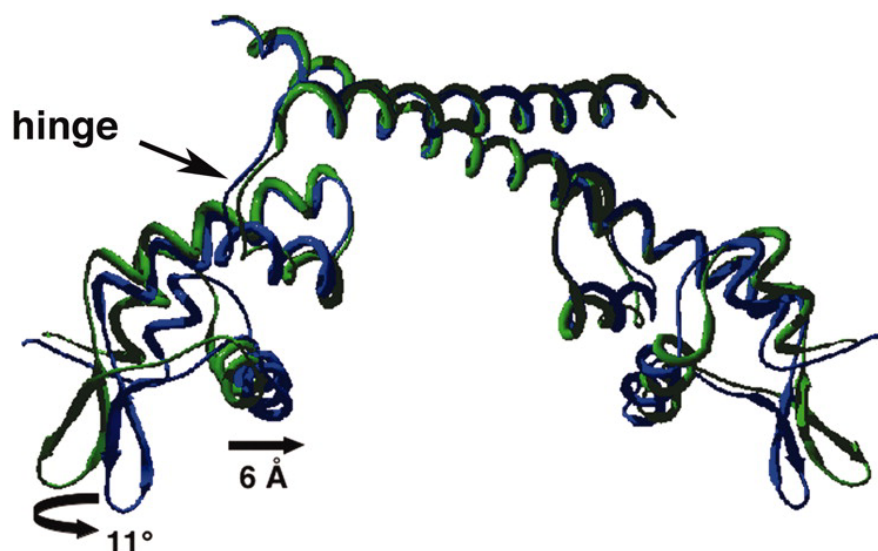


Figure I.10 : Superposition des structures de MtaN cristallisées en absence d'ADN (verte) et en présence d'ADN (bleue) (78)

I.4 La famille du régulateur NikR

NikR, qui a premièrement été découvert chez *E. coli*, régule l'expression transcriptionnelle des protéines impliquées dans l'importation du Ni(II) (38). Il est actuellement le seul membre caractérisé de cette famille. NikR fixe du nickel pour ensuite se lier à une séquence opératrice qui précède l'opéron *nikABCDE*. L'expression des gènes de l'opéron *nik* est alors réprimée. Cet opéron code pour cinq protéines : NikA constitue une protéine périplasmique et Nik B, C, D et E constituent un transporteur de type ABC spécifique du Ni(II). Le gène *nikR* fait suite à l'opéron *nik*. La séquence reconnue contient deux hexamères de paires de bases conservées séparés par 16 pb variables (27).

La protéine NikR, qui est sous forme d'un dimère de dimère de 4×133 amino-acides (4×15 kDa), comprend un motif ruban-hélice-hélice de liaison à l'ADN dans le domaine N-terminal et au moins un site de liaison du Ni(II) dans le domaine C-terminal. NikR lie le Ni(II). Une forme dimère existe à bas pH et la tétramérisation est augmentée par la présence de Ni(II). Les mécanismes exacts par lesquels s'opèrent la liaison et la reconnaissance du Ni(II) ainsi que la liaison à l'ADN sont peu connus. Le K_d décrit pour la liaison du Ni(II) par NikR est de l'ordre du pM (28) mais le doute existe quant à

l'exactitude de cette valeur. Il semblerait également qu'au moins un second site de liaison du métal existe et qu'il soit impliqué dans le mode de reconnaissance de l'ADN, ce site n'est pas encore caractérisé (12, 23, 28, 39, 99, 112).

Les premières structures cristallographiques du domaine Cter-Ni et de la forme apo-NikR d'*E.coli* ont été résolues en 2003 (99). Par unité monomérique, 1 Ni(II) se voit coordonné par 3 histidines et 1 cystéine dans un site ayant une géométrie "plan-carré". Le Ni(II) se situe à l'interface de 2 monomères. Le site de liaison du Ni(II) est à ~ 40 Å du site de liaison à l'ADN. Ceci laisse suggérer que le Ni(II) active la liaison à l'ADN à distance. Un réarrangement structural de la protéine allant lier l'ADN vient d'être proposé à partir des structures de NikR de *Pyrococcus horikoshii* (29) métallées et non métallées. (Figure I.11 et Figure I.12). Un basculement du domaine de liaison avec l'ADN serait engendré à longue distance par la fixation du Ni(II) dans la zone centrale (interface dimère/dimère). Le deuxième site de fixation du Ni(II) ne serait peut être pas spécifique (K^+ au lieu de Ni(II) dans une structure du complexe ADN/protéine en cours de publication).

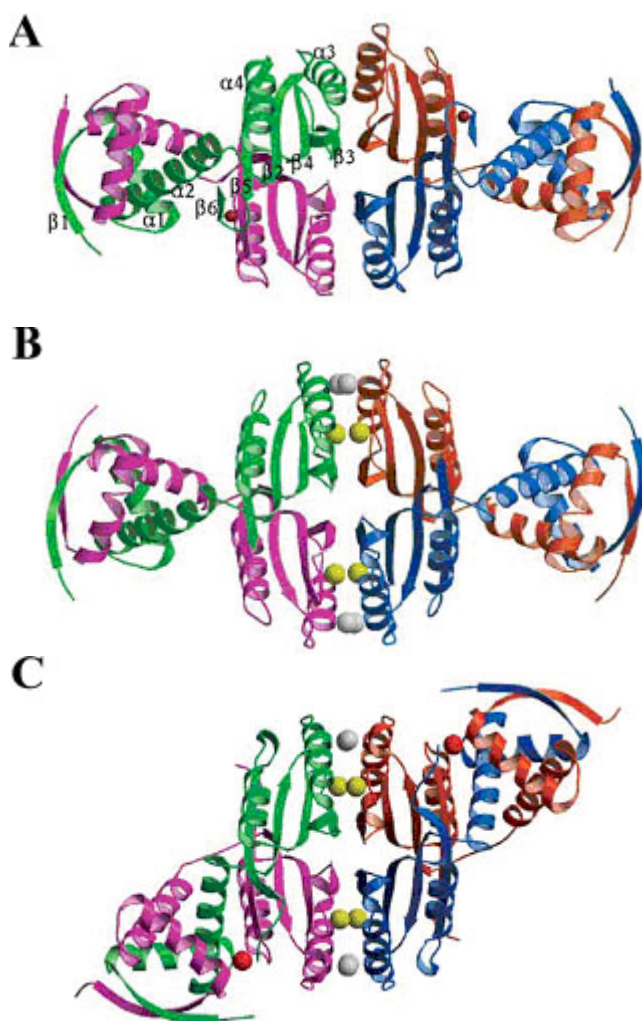


Figure I.11 : A) Structure de apo NikR, B) et C) structures de formes métallées par le nickel(II) (sphère jaune, grise et rouge) de *Pyrococcus horikoshii* (29).

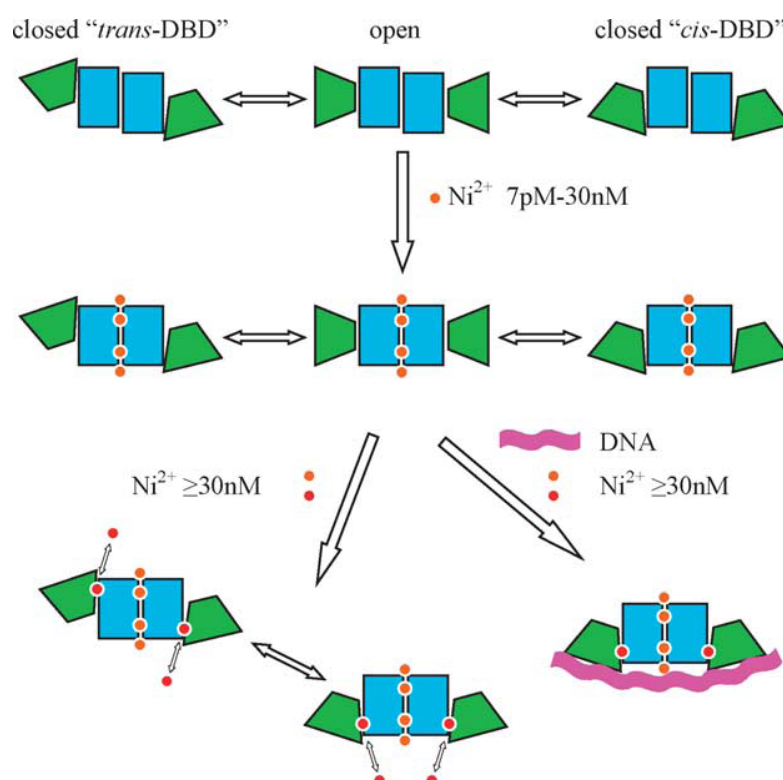


Figure I.12 : Mécanisme d'activation par le nickel(II) avec basculement des domaines de liaison à l'ADN, proposé par P. Chivers et *al.*(29).

I.5 La famille des régulateurs DtxR

La famille des métallobrégulateurs DtxR est constituée de protéines reconnaissant le fer comme cofacteur. DtxR de *Corynebacterium diphtheriae* utilise le Fe(II) comme cofacteur *in vivo* pour réguler négativement les gènes impliqués dans l'acquisition du fer et l'expression de la toxine diphtérique, un facteur de virulence majeur (84). La liaison du fer par DtxR entraîne l'activation de la protéine pour sa liaison à l'ADN. Cette liaison réprime l'expression des gènes placés sous son contrôle. En carence de fer, les gènes codant pour DtxR/IdeR sont constitutivement exprimés.

Régulateurs	fonction	Activateur	Référence(s)
DtxR	homéostasie du Fe(II) et contrôle de la synthèse de la	Fe(II)	(49)
IdeR	toxine de la diphtérie	Fe(II)	(13, 98)
MntR	Homéostasie du Fe(II)	Mn(II)	(97)
TroR	Homéostasie du Mn(II) : MntA,B,C et H	Mn(II)/Zn(II)	(92)
	Régulation <i>troA</i>		

Tableau I.4 : Exemples de régulateurs de la famille DtxR.

I.5.1 Caractéristiques structurales des régulateurs transcriptionnels de la famille DtxR

De nombreuses structures cristallographiques de DtxR et de IdeR sont disponibles et plus de 18 structures contenant divers métaux et des complexes ternaires protéines/métal/ADN ont été résolues. De même que toutes les familles vues précédemment, les métallos-régulateurs de la famille DtxR appartiennent à la grande famille des régulateurs à motif H-T-H. DtxR et IdeR possèdent 3 domaines (Figure I.13) :

- un domaine de liaison à l'ADN contenant le motif hélice-coude-hélice ailé ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 2$), $\alpha 3$ étant l'hélice de reconnaissance.
- un domaine de dimérisation contenant deux sites métalliques (site 1 et site 2)
- un domaine de régulation de type SH3 (sauf pour MntR, (54)). Un domaine SH3 possède un repliement caractéristique. Il possède 5 ou 6 brins β formant 2 feuillets β antiparallèles. Un des rôles proposé pour ce type de domaine serait l'interaction avec des zones riches en prolines (77).

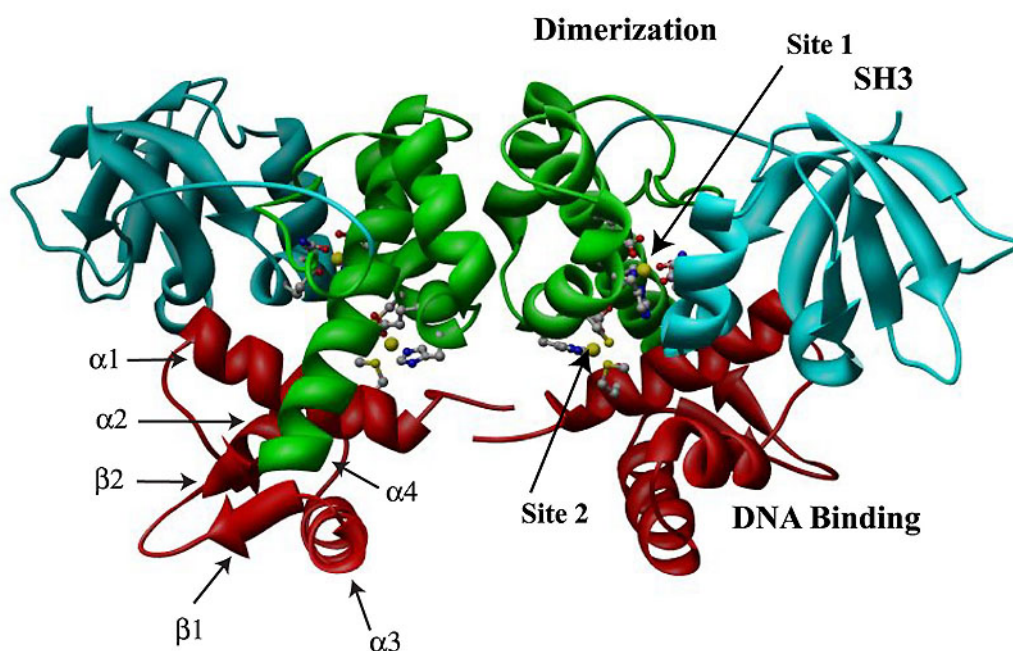


Figure I.13 : Structure cristallographique de IdeR cristallisée en présence de Co(II) et d'ADN (90). Seule la structure d'un dimère du complexe est montrée pour plus de clarté. Les atomes de Co(II) sont en jaune, le domaine de liaison à l'ADN est en rouge, le domaine de dimérisation en vert et le domaine SH3 en cyan. L'hélice $\alpha 3$ est l'hélice de reconnaissance de l'ADN.

DtxR et IdeR sont des monomères en solution mais des études récentes montrent qu'ils dimérisent en présence de métal avec un K_d qui passe de 0.5 μM à 33 nM (102). Un état de molten globule a été proposé pour DtxR en absence de métal. L'utilisation d'un mutant IdeR C102S (où le site métallique 2 est altéré) a permis d'établir que le site 1 est important pour la dimérisation, les propriétés de dimérisation de ce mutant étant identiques à celles de la protéine sauvage (30). En absence de métal dans le site 1, IdeR se trouve sous deux formes en équilibre (Figure I.14). Une forme « ouverte » et une forme

« fermée ». La forme fermée correspond à la forme où le domaine SH3 interagit avec la région riche en prolines comme cela a été observé pour DtxR par RMN (111). De plus, le domaine SH3 fournit deux ligands pour le métal dans le site 1 comme cela a été observé dans une des structures cristallographiques de Co(II)-DtxR (90), et deux structures de Co(II)-IdeR (47, 115). Le site 1 est hexacoordonné dans DtxR en présence de Co^{2+} et pentacoordonné dans IdeR avec le même métal. Le site 2 est, quant à lui, penta coordonné dans les deux protéines lorsqu'il contient du Co^{2+} . L'occupation du site 1 serait importante pour la bonne orientation du site 2. Le site métallique 2 serait important pour la liaison à l'ADN. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le mutant C102S d'IdeR est incapable de lier l'ADN (30).

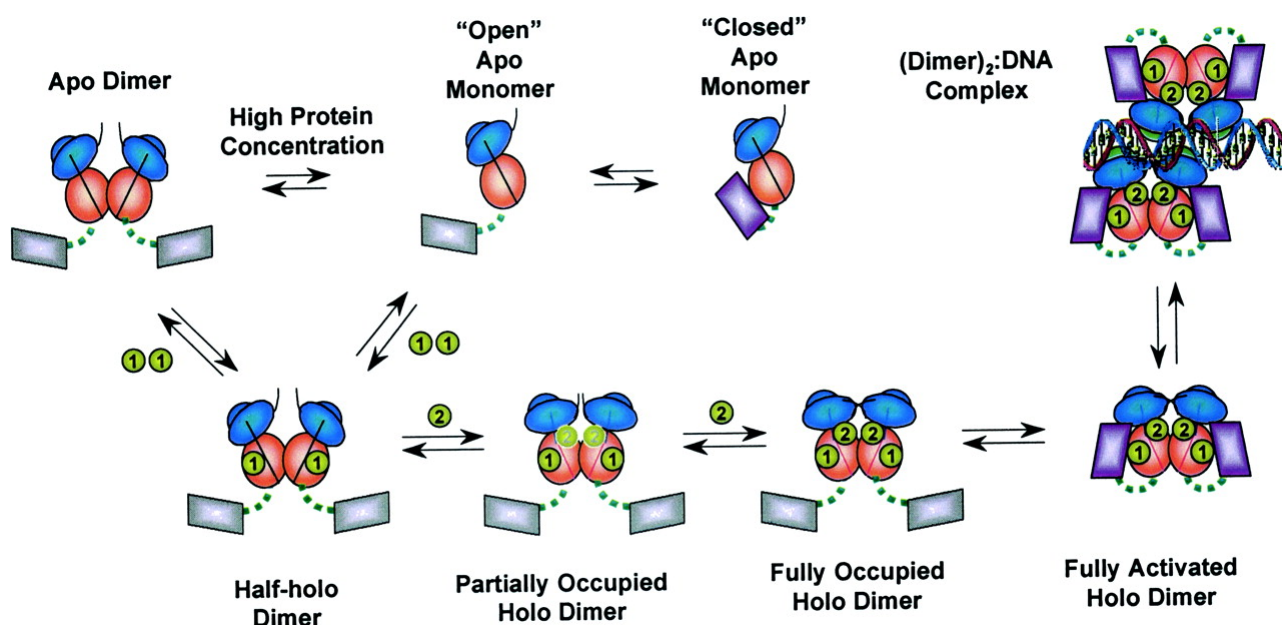


Figure I.14 Modèle proposé d'activation de apo IdeR (issu de (30))

Ce mécanisme ne peut être valable pour tous les membres de cette famille puisque MntR, un autre membre de cette famille est un dimère en solution même en absence de métal et ne possède pas de domaine SH3. La forme dimère de MntR est probablement stabilisée par la présence d'une hélice α ($\alpha 7$, résidus Asp123 à Lys136) supplémentaire au niveau de l'interface de dimérisation (54) par rapport aux structures de DtxR et IdeR. La métallation de MntR par le manganèse n'induit pas de changement en dichroïsme circulaire mais un changement de la stabilité thermique de la protéine (55).

I.5.2 Mécanisme d'activation

L'incorporation du métal entraîne un rapprochement des hélices d'interactions avec l'ADN de 2 Å qui permettrait de mieux aligner ces hélices pour qu'elles interagissent avec les grands sillons de l'ADN. D'autre part, une déstructuration des premiers résidus de l'hélice $\alpha 1$ (environ un tour d'hélice) de la forme holo a été observée (113). Cette déstructuration provient de la liaison d'un acide aminé de cette

hélice à l'ion métallique activateur (met10 dans le cas de DtxR). Elle permettrait d'éliminer des interactions stériques défavorables entre cette hélice et l'ADN.

La superposition des dimères des formes apo et holo montre qu'une des deux sous-unité de l'apo dimère est totalement superposable avec une sous-unité du complexe Co(II)DtxR/ADN (90) (Figure I.15). Si l'on compare la superposition au niveau des autres sous-unités, la déviation standard au niveau du domaine de dimérisation est de 1,1 Å. Par contre, la déviation standard des domaines N terminaux est de 2,4 Å. Ceci indique clairement que l'activation entraîne un déplacement du domaine N terminal vis-à-vis du domaine de dimérisation de chaque sous-unité.

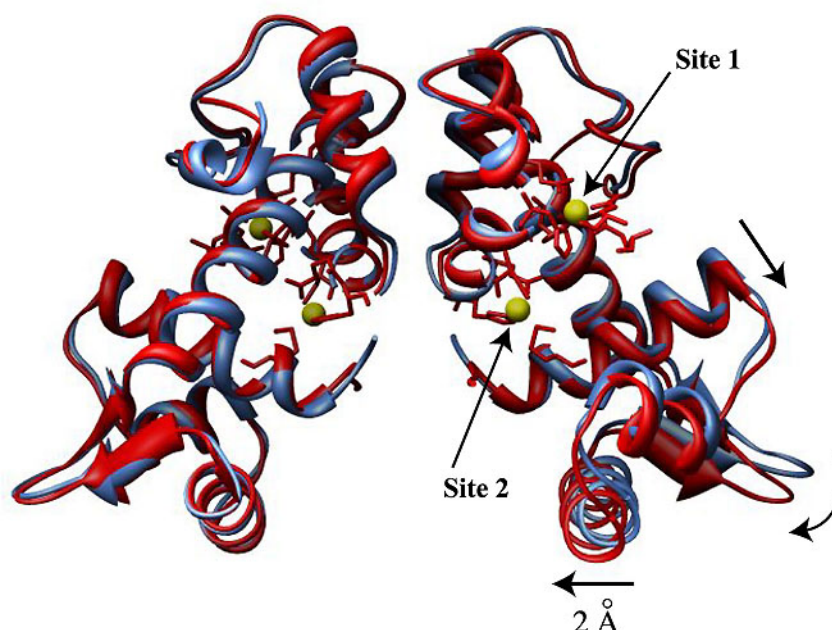


Figure I.15 : Superposition des formes apo (bleue) (89) et du complexe Co(II)DtxR/ADN (rouge) (90) en présence de Co^{2+} de DtxR. Les ions Co(II) sont visualisés en jaune sur cette figure. Les domaines SH3 ne sont pas visualisés pour plus de clarté. L'ADN du complexe n'est pas visualisé.

Les structures des complexes protéines/métal/ADN indiquent que DtxR et IdeR reconnaissent une séquence d'ADN palindromique et se fixent sur l'ADN sous forme de deux dimères (Figure I.16) (7, 26, 47, 90, 91, 113, 115).

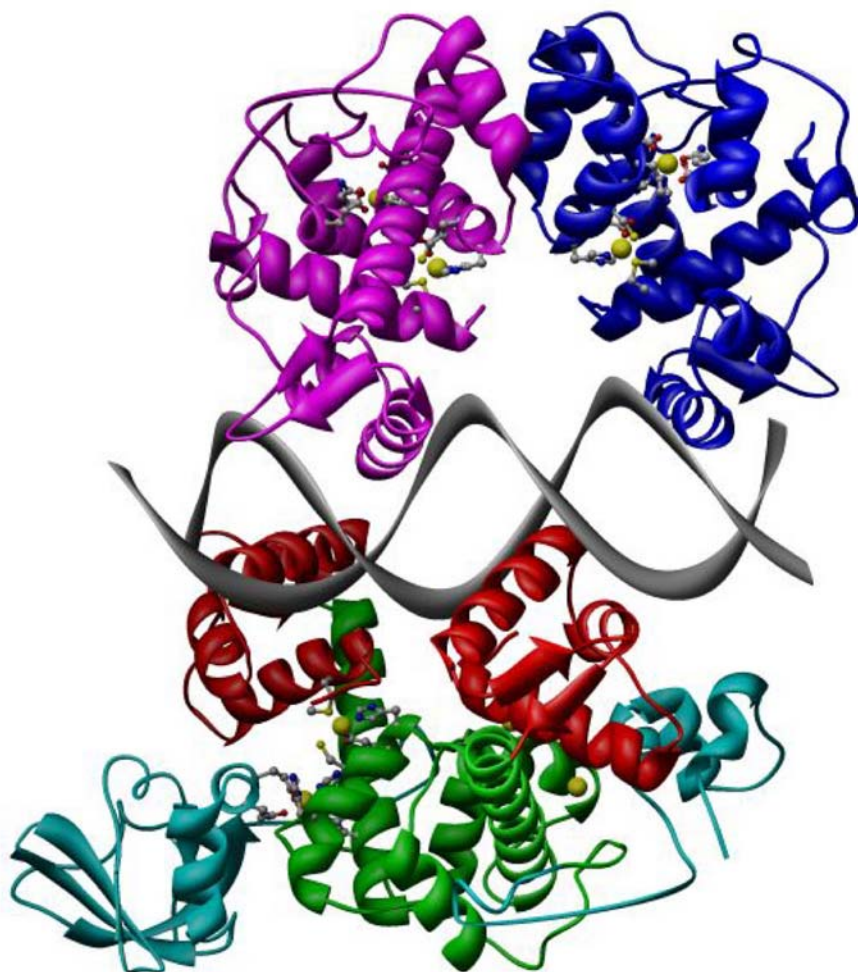


Figure I.16 : Structure du complexe DtxR/ADN. Le complexe est un dimère de dimère sur l'ADN. Les différents domaines d'un monomère de DtxR sont représentés en rouge (domaine de liaison à l'ADN), vert (domaine de dimérisation) et cyan (domaine de type SH3). Les atomes de Co(II) sont en jaune. Les domaines SH3 ne sont pas visualisés sur le dimère du haut pour plus de clarté.

Des études d'interactions IdeR/ADN suivies par anisotropie de fluorescence ont indiqué que la liaison à l'ADN est coopérative (30). Le travail des auteurs ne permet pas de définir l'origine de la coopérativité. En effet, celle-ci peut provenir de la fixation d'un monomère sur l'ADN qui facilite la fixation d'un deuxième monomère par des interactions protéines/ADN et protéines/protéines. Une autre hypothèse est que la coopérativité observée provient de la fixation d'un dimère sur l'ADN qui facilite la fixation d'un second dimère. En effet, bien qu'il n'existe pas de contact entre les dimères sur l'ADN, la structure de l'ADN est déformée par rapport à la structure canonique d'un ADN B (26, 47, 90, 91, 115). On peut donc supposer que la fixation d'un dimère entraîne une distorsion de l'ADN facilitant la fixation du deuxième dimère.

Beaucoup de propriétés de la famille de DtxR vont se retrouver dans la famille de Fur comme nous allons le voir.

I.6 La famille des régulateurs de type FUR (Ferric Uptake Regulator)

La famille des régulateurs de type FUR regroupe des protéines impliquées dans l'homéostasie de métaux essentiels et/ou dans la résistance au stress oxydant. Le stress oxydant et l'homéostasie du fer sont liés de façon inextricable par la capacité du Fe(II) à catalyser la formation de radicaux hydroxyles à partir de peroxyde d'hydrogène (75).

Ces protéines sont constituées de deux domaines : un domaine de liaison à l'ADN de type hélice-coude-hélice ailé et un domaine de dimérisation dans lequel se situe la majorité des ligands des ions métalliques. Les formes apo sont généralement incapables de se lier à l'ADN. C'est la liaison du métal qui active ces protéines et entraîne leur liaison à l'ADN. La liaison à l'ADN entraîne la répression de la transcription des gènes.

Répresseur	Protéine dont l'expression est régulée (fonction)	Activateur(s)	Référence(s)
FUR	Plus de 100 protéines impliquées dans l'homéostasie du Fe(II), la virulence et la réponse à différents stress : oxydant, acide...	Fe(II)	(61)
FURA	Résistance au stress oxydant	Fe(II)	(58)
FURS	Résistance au stress oxydatif	Fe(II)	(80, 119)
ZUR	protéines impliquées dans le transport du Zn(II) : ZnuA (protéine périplasmique) ; ZnuB (protéine membranaire) ; ZnuC (ATPase)	Zn(II)	(52, 85)
PerR	Résistance stress oxydant	H ₂ O ₂	(17, 18)

Tableau I.5 : Exemples de régulateurs de la famille FUR.

Nous allons maintenant détailler les propriétés des protéines FUR, en particulier celle d' *E. coli* sur laquelle nous avons travaillé et celle de *Pseudomonas aeruginosa* pour laquelle la première structure cristallographique a été décrite (88).

I.7 La protéine FUR, un régulateur global

1.7.1 La découverte de FUR

En 1956, Garibaldi *et al.* ont montré que l'expression des systèmes d'acquisition du fer était négativement régulée par le fer lui-même (53). Par la suite, Ernst *et al.* ont isolé une souche mutante de *Salmonella typhimurium* produisant de façon constitutive certains sidérophores, et ont suggéré que la mutation affectait un gène responsable de la régulation des systèmes d'acquisition du fer ; ce gène a été

nommé *fur* (ferric uptake regulation) (42). En 1981, Hantke a décrit à son tour un mutant d'*E.coli* exprimant de façon constitutive des fonctions connues pour être régulées par le fer (production de sidérophores, de récepteurs,...) (59). L'hypothèse pour expliquer ce comportement fut la mutation du gène *fur*. Par la suite, le gène *fur* fut cloné (60) et séquencé (96). La protéine FUR contrôle donc l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition et le stockage du fer.

Lorsque la cellule se trouve à l'équilibre, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de carence en fer, la protéine FUR est active et réprime l'expression de tous les gènes impliqués dans l'acquisition du fer (biosynthèse de sidérophores, systèmes de transport du fer) (Figure I.17). Dans ces conditions, le Fer(II) joue le rôle de cofacteur permettant l'activation de la protéine. Celle-ci peut alors se fixer sur des séquences spécifiques d'ADN situées dans la région promotrice des gènes qu'elle régule (37).

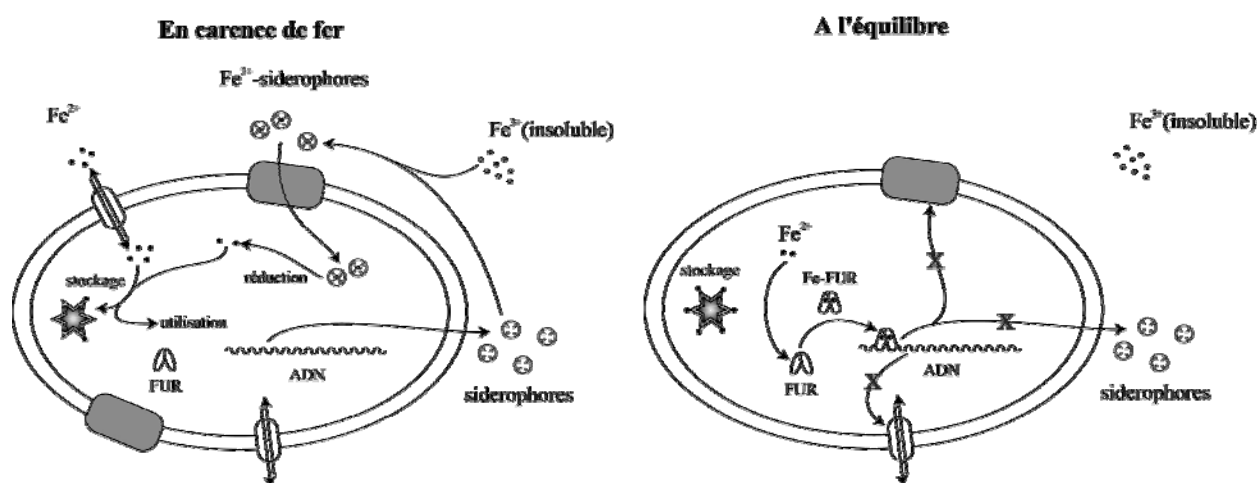


Figure I.17 : Représentation schématique du mécanisme de contrôle de l'acquisition du fer par FUR dans la bactérie. Lorsque la bactérie est en carence de fer, elle synthétise des sidérophores qui vont complexer le Fe^{3+} avec une forte affinité. Le complexe est ensuite pris en charge par des systèmes de transport spécifiques puis internalisé dans la bactérie. Le Fe^{3+} est libéré par réduction puis le Fe^{2+} est pris en charge pour être soit stocké soit utilisé. A l'équilibre, la quantité de fer dont dispose la cellule est suffisante. Dans ces conditions, la protéine FUR est active et réprime l'expression de tous les gènes impliqués dans l'acquisition du fer.

Depuis sa découverte, de nombreux homologues de *fur* ont été identifiés dans un grand nombre de bactéries Gram négatives dont plusieurs pathogènes humains comme *Yersinia pestis* (103) ou *Pseudomonas aeruginosa* (93). La plupart de ces homologues sont capables de compléter une souche *E.coli* déficiente en protéine FUR ce qui suggère que le mécanisme d'action est probablement semblable dans différents micro-organismes.

La régulation de l'acquisition du fer fut le premier rôle décrit pour FUR, mais cette protéine intervient en fait dans la régulation de nombreux processus. En effet, à ce jour plus de 100 gènes ont été identifiés comme régulés par FUR chez *E.coli* (61). La plupart codent pour des protéines impliquées dans l'acquisition du fer (60 sont connus) mais d'autres sont impliqués dans des processus aussi variés que la respiration (*cyoA*), la motilité (*FlbB*), la glycolyse (*gpmA*), la virulence (*hly*) ou encore la protection contre le stress oxydant (*sodA*). C'est pour cela que FUR est considérée comme un **régulateur global**.

I.7.2 Quelques caractéristiques sur la séquence de FUR

Chez *E.coli*, le gène *fur* code pour une protéine de 16795 Da contenant 148 acides aminés (147 sans la méthionine N terminale). Cette métalloprotéine possède de nombreux acides aminés pouvant potentiellement être des ligands pour des métaux (tyrosines, aspartates, glutamates, asparagines, arginines, cystéines, histidines) dont 12 histidines. (Figure I.18)

```

      10      20      30      40      50      60
TDNNTALKKAGLKVTLPRLKILEVLQEPDNEHVSAEDLYKRLIDMGEEIGLATVYRVLNQ
      70      80      90     100     110     120
FDDAGIVTRHNFEGGKSVFELTQQHHHDLICLDGKVIIEFSDDSI EARQREIAAKHGIR
      130     140
LTNHSLYLYGHCAEGDCREDEHAHEGK

```

Figure I.18 : Séquence peptidique de FUR d'*E.coli* (GenBank). La méthionine N terminale n'est pas indiquée du fait de son excision par la bactérie

L'alignement des séquences de FUR de différents micro-organismes montre que certains acides aminés sont très conservés comme les glutamates 80 et 100, les arginines 18 et 56, les histidines 32, 86, 87, 89, 124 et les cystéines 92, 95 et 132 en rouge dans la Figure I.19.

Fur E.coli : MTDNNTALKKAGLKVTLPRLKILEVLQEPDNHVSADLYKRLIDMGEEIGLATVYRVNLQFDDAGIVTRHN
 Pasteurella multocida : MSNIKLLKKAGLKITEPRLTILALMQEHQEEHFSADVYKMLLERGEEIGLATVYRVNLQFDEAKILIRHN
 alcaligenes eutrophus : .MSPADLKNIGLKATVPRLKILEIFQTSQRHLAEDVYRILLNEHMDIGLATVYRVLTQFEAQGLLSRNN
 Pseudomonas fluorescens : .MENSELRKAGLKVTLPRLKILEVLQEPDNHVSADLYKRLIDMGEEIGLATVYRVLTQFEAAGLVVRHN
 Klebsiella pneumoniae : MTDNNTALKKAGLKVTLPRLKILEVLQEPDNHVSADLYKRLIDMGEEIGLATVYRVNLQFDDAGIVTRHN
 Campylobacter jejuni : LLEFKKILRQGGKYTKQREVLLKTLYH.SDTHYTPESLYMEIKQAEPDVGATVYRTLNLLAEAEMVTSIS
 Vibrio parahemolyticus : MSDNNQALKDAGLKVTLPRLKILEVLQEPDNHVSADLYKRLIDMGEEIGLATVYRVNLQFDDAGIVTRHN
 Acinetobacter calc. : .MPSNQDLRKAGLKVTLPRLKILELLEN.SKQHLAEDIYKTLLEQGEDVGLATVYRVLTQFEAAGIQRHH
 Xanthomonas campestris : ...ETHDLRKVGLKVTHPRLKILELLEQKSNQHLAEDTYRQLLDHGDEIGLATVYRVLTQFEAAGLVKHN
 Helicobacter pylori : ILELRMSIKKNGKNSKQREEVSVLYR.SGTHLSPEEITHSIRQKDKNTSISSVYRILNLFLEKENFICVLE
 Neisseria gonorrhoeae : EKFNIAQLKDSGLKVTGPRLKILDLEFKHAEHLSADVYRILLEEGVEIGVATIYRVLTQFEAQGLIRHH
 Bordetella pertussis : .MDQSELKNMGLKATFPRLKILDIFRKSDDLHLAEDVYRALIAENVEIGLATVYRVLTQFEAQGLITRSQ
 Aquifex aeolicus : LKKFTKFLKKKNMKVTKSRNLNLDLIAD.YNKHFEIEELVNWIANHKDKVSRSTVYRTVKLLEEFAGVKEVI
 Listeria monocyt. (Zur) : TATALMKMKEGKYKHTDKREFLINLLAR.KNKYLTAQDVLENMKDDFPGISPTIYRNLSLFVELGFEETD
 Staphylococcus epiderm. : NTNAIKILKDNGLKYTDKRLKMDLDFVE.EDKYLNAKHQQKMDKDPYGISFDTVYRNLHLFKDLGIESTE
 Mycobacterium tubercul. :MSAAGVSTRQRAAISLTLET.LDDFRSAQELHDELRRRGENIGLTTVYRTLQSMASGLVDTLH
 Streptomyces reticuli : PTPTAEELRGAGLRVTAARVALLETVRD..GDHLGVEAIASGVRDRVGHISLQAVYEAHALTAAGLVRRIE
 Desulfovibrio vulgaris :MSQTRMTQRMVILEELRK.VDTHPTADEIYAMVRSRIPRISLGTVYRNLDLLEAESGILKLE
 Bacillus subtilis : ELKALETLLKETGVRIITPQRHAILEVLVN.SMAHPTADDIYKALEGKFPNMSVATVYNNLRVFRSEGLVKELT
 Aquifex aeolicus : RLEFVKRCKETGLKITPQRMVAVYEVLLK.SDNHPTVEEIEYEVKKLYPYVSLATVYRTLETENIGLVKKVC
 Legionella pneumophila : .MESQQ.LKDAGLKITLPRLKIVLQILEQ.SRNLHSAEAVYKALLESGEDVGLATVYRVLTQFEAAGLVSRHN
 Haemophilus ducreyi : MSENTKLLKSVGLKVTEPRLTILALMQQYREEHFSADYKLLLEQSSDIGLATVYRVNLQFEVGVILLRHN
 Brucella abortus : TKPYEQELRRAGVRITRPRILNINLNE.TEDHPDALEIFRRAVEEDDSISLTVYRTMKLLEERGAIRHRA
 Rhizobium leguminosarum : VAKLEELCTERGMRMTEQRRVIARILED.SEDHPDVEELYRRSVKVDAKISISTVYRTVKLFEDAGIARHD
 Bradyrhizobium japonicum : KASIEARCAATGMRMTQRRVIARVLA.AVDHPDVEELYRRCAVADDKISISTVYRTVKLFEDAGIIERHD
 Synechocystis sp. : TADLKAEINARGWRLTPQREKILITIFQNLPEGHLSAEELHHRLEEREKISLSTVYRSVLKMSRMGILRELE
 Thermotoga maritima : MYELRNLKKRKYRTAQREMILKIFLESRGRHLGVEEYRELLNRNVRISKATVYRSVELLVELGFLRLKN

 : 1-----11-----21-----31-----41-----51-----61-----71

 Fur E.coli : FEGGKSVFELTQQHHHDHLICLDCKGKVFESDDSIARQREIAAKHGIRLTNHSLSLYLGHCAEGDCREDEHAHEGK
 Pasteurella multocida : FEGNKSVFELAPTQHHDHIIICVDCGKVEFNDDIIEKQREITKQHGIELATHSLSLYLGHCSNVKCDENGKR....
 alcaligenes eutrophus : FESGKAIFELNEGKHHDHLVCLDCGRVEFFDADIEQRQSIARERGFALQEHALSLYGNCTK.DCPRPRR....
 Pseudomonas fluorescens : FDGGHAVFELADGGHHDHMDVLDLTNEVIEFTSPEIEALQHKIAEEHGFDLVD.....
 Klebsiella pneumoniae : FEGGKSVFELTQQHHHDHLICLDCKGKVFESDDSIELRQREIASRHGIRLTNHSLSLYLGHCAEGDCRETNPTTRW
 Campylobacter jejuni : FGSAGKKYELANKPHHDHMIKCNCGKIEFENPIIERQALIAKEHGFKLTGHLMLQYGVCGDCNQKAKVKI....
 Vibrio parahemolyticus : FEGGKSVFELSTQHHHDHLVCLDCGVEFESDDIIEERQREIAAKYNVTLTNHSLSLYLGHCSGDKENRDAHKPA
 Acinetobacter calc. : FENNHSVFELIMQEDHHDHLVCLNCGKVEFTNEVIEHQHTVAEKHGFTLTGHSLSLYLGHCDATEQEAYRKKQ...
 Xanthomonas campestris : FEGGQAVYELDRGGHHDHMDVLDVDTGHVIEFESEIEALQRIIAKHGSELEHSPVLYVRKKRPR.....
 Helicobacter pylori : TSKSGRRYELIAAKEHHDHIIICLHCGKIEFADPEIEHRQNEVVKYQAKLISHDMKMFVWCKEQCSD.....
 Neisseria gonorrhoeae : FETGKAVYELDKGDHHDHIVCVKCGEVTEFHNPEIEALQDKIAEENGRIYVDHALYMYGVCS...CQAKGKR....
 Bordetella pertussis : FDTGKAVFELNDGDHHDHLICTNCGTVFESDPDIEKQYKAKDNGFVLESHAMVLYGICG...CQ.KGR....
 Aquifex aeolicus : KKDNTIYEFVIGRHHDHLVCTECGRIEFVDEEIEKLQEEICKKYNFKPAHHRLEIFIGICEQCQSK.....
 Listeria monocyt. (Zur) : LS.GERNFRLACTHHHHHFCMKCGKTEIMMCPMDFLTALP...GYQIDGHKFEVYGECE..CLQAS.....
 Staphylococcus epiderm. : LE.GEMKFRIACTNHHHHFICENCGDTKVIDFCPIEQIKQYLP...NVTIHTHKLLEVYGVCS..CQKNA.....
 Mycobacterium tubercul. : TDTGESVYRRCEHHHHHLVCRSCGSTIEVGDEHVEAWAAEVATKHGFSVDSHTIEIFGTCS..CRS.....
 Streptomyces reticuli : PAGHPARYEGRVGNHHHIVCRSCGAVADVCAVDAPCLTAADHGFAIDEAEVYVWGLCPDCSGRSS.....
 Desulfovibrio vulgaris : AAGTQKRFDGNTMH.HQHVRCIRCGRVGDMHP.LDVPQPERAAAGFTILTARVEFEGICDH..CTAHS.....
 Bacillus subtilis : YGDASSRFDVFTSD.HYHAICENCGKIVDFHPYGLDEVEQLAAHVTFGKVSHRLEIYGVQCECSKENH.....
 Aquifex aeolicus : FWGNSARYDANLEE.HHHLICCKCGKIEDIKLDQKLNIPPEFY...GYKTESYSVNVIYGCPCD..CRAKMQS....
 Legionella pneumophila : FEGGHSVFELSQGEHHDHLVCKVCGRVEFVDEIEQRQKAIARAHFKMTDHALNIYGTCP..QQ.....
 Haemophilus ducreyi : FDSNKAVFELNVDEHHDHIIICMDCKGVEFKDPDIERRQREISEQHGMKLATHSLYLYAKCSDISCDKDKKD...
 Brucella abortus : FAGGPRFELQASGAHHDHIIIDMSGDVVEFHSDKIEKLQEEIARSLGFELVHHRLELYCKKLS.....
 Rhizobium leguminosarum : FRDGGSRYETVPEHHDHLIDLKGTGTVIEFRSPEIEALQERIAREHGFRLVDHRLLEYGVPLKKEL.....
 Bradyrhizobium japonicum : FREGRARYETMRDHHHDHLINLRDGKVIETSEEIEKLQAEIARKLGKLVDRHRLLEYCVPLD.DKPTS.....
 Synechocystis sp. : LAEGHKHYELQQAASHHHHVVCQCNRTIEFKNDSILKQSLKQCEKEGFLIDCQLTVTITICPEAICTRSISLA...
 Thermotoga maritima : FGEGLYRYELADRSSHQHVICQKCGRIVEINSEQVNKIIISDISKTKGYVIKWHDLKFYGCPECQKEEERKSK...

 : -----81-----91-----101-----111-----121-----131-----141

Figure I.19 : Alignement des séquences de protéines FUR de différents micro-organismes obtenus à partir de la banque de données GenBank. Les acides aminés en rouge sont des ligands potentiels.

1.7.3 Caractéristiques biochimiques de FUR

La dernière étape de purification de FUR utilise une colonne de filtration sur gel afin de séparer les différents oligomères de la protéine. Ainsi, la protéine FUR est majoritairement éluée à un volume correspondant à un dimère de 2 fois 17 kDa (2).

Des expériences de pontage avec l'EDC (1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide, un réactif permettant de créer une liaison amide entre une amine primaire et un carboxylate en interaction ionique, ont permis de ponter deux sous-unité monomérique de FUR. L'analyse par spectrométrie de masse, après digestion des protéines pontées par des endoprotéases, a permis de localiser la zone de pontage. Ainsi, il a été montré que l'extrémité N terminale d'une sous-unité était pontée avec un des 8 derniers résidus de l'extrémité C terminale de l'autre sous-unité (56).

D'autres formes de plus haut poids moléculaire correspondant à des tétramères et plus sont également observées. Ces formes oligomériques de haut poids moléculaires sont en équilibre avec le dimère. Cet équilibre est dépendant de la concentration en FUR et favorise la formation d'oligomères avec la concentration croissante de FUR. Cet équilibre d'oligomérisation peut être ralenti par de fortes concentrations en sels (500 mM de KCl) (35).

Une autre forme de FUR est également éluée à un volume supérieur à celui du dimère. Il s'agit d'une forme monomérique. Nous reviendrons plus tard (Chapitre IV) sur cette forme dont l'étude correspond à une partie du travail qui vous sera présenté.

Afin de savoir si, *in vivo*, la protéine FUR est active sous forme oligomérique, des expériences de complémentations négatives ont été réalisées par Braun *et al.* (14). Dans une souche sauvage (FUR⁺) une protéine FUR mutante inactive est insérée par le biais d'un plasmide. Cette souche exprime donc à la fois une protéine sauvage et une protéine mutante. Pour contrôler l'activité FUR de la cellule, un gène rapporteur (*lacZ*) a été introduit dans la souche sauvage et a été placé sous le contrôle de FUR. Si le phénotype de cette souche devient celui d'une souche FUR⁻, la protéine s'est assemblée en hétéro-oligomère inactif. Dans cette expérience, les auteurs ont observé une dérégulation du gène *lacZ* lorsque la protéine mutante inactive a été exprimée dans la souche sauvage. Ces résultats indiquent donc que, *in vivo*, la forme normalement active de FUR est une forme oligomère au moins dimérique.

1.7.4 Les domaines fonctionnels de FUR

L'utilisation de protéines de fusion par Stojiljkovitch et Hantke en 1995 a permis d'identifier 2 domaines fonctionnels dans la protéine FUR. L'expérience consistait à fusionner le domaine N terminal de la protéine FUR d'*E.coli* (résidus 1 à 81) avec le domaine C terminal du répresseur λ CI857 (impliqué dans sa dimérisation) et, d'un autre côté, de fusionner le domaine C terminal (résidus 74 à 147) de FUR avec le domaine N terminal (domaine de liaison à l'ADN) de ce même répresseur. Dans les deux cas, des protéines chimères actives ont été obtenues. Ceci a permis de montrer que le domaine N-terminal de FUR correspond au domaine de liaison à l'ADN tandis que le domaine C-terminal est important pour la dimérisation.

1.7.5 Eléments de structure

D'après une étude sommaire (figure non montrée) par dichroïsme circulaire, le domaine N terminal de FUR est riche en hélice α (114). Une étude RMN homonucléaire a également été réalisée par Saito et *al* en 1991. A la fin de leur étude, ils proposent un modèle de FUR (95). D'autre part, une première prédiction de structure secondaire réalisée par Holm et *al*. a suggéré la présence d'un motif de liaison à l'ADN de type hélice-coude-hélice ailé situé dans le domaine N terminal de la protéine. Cette étude a été obtenue à partir de la comparaison des séquences de FUR de 6 micro-organismes avec des répresseurs de structure connue (LexA, HNF3, Histone H5) (64). Une seconde prédiction de structure secondaire, sur le serveur JPred (34), réalisée à partir d'un plus grand nombre de séquence de FUR par Anne Gonzalez de Peredo (57), a permis de confirmer les résultats de Holm et *al*. (64). Avec ces données, le modèle de Saito et *al*. n'est ni confirmé par les prédictions de structures secondaires, ni par l'étude RMN qui vous sera ici présentée.

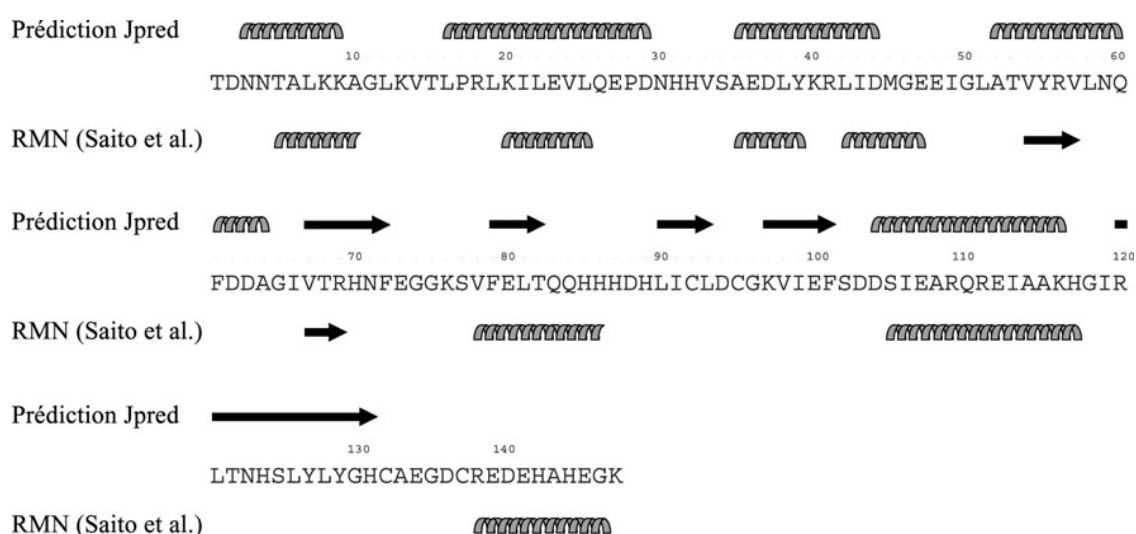


Figure I.20 : Comparaison de la prédiction de structure secondaire obtenue avec Jpred (34, 56) avec les données RMN obtenue par Saito et *al*. (95). La prédiction de structure avec le serveur JPred suggère la présence d'un motif de liaison à l'ADN de type hélice-coude-hélice ailé. Les données RMN et la prédiction de structure ne sont pas en accord.

1.7.6 Les sites métalliques

Des mesures ICP-MS réalisées au laboratoire ont montré que les préparations d'apo protéine dimérique de FUR, obtenues par la méthode de purification décrite par Wee et *al.*, contenaient entre 0,5 et 0,8 atomes de Zn par monomère (74). Althaus et *al.*, sur des échantillons obtenus de façon similaires, ont montré la présence de $2,1 \pm 0,5$ atomes de Zn par monomère. Après traitement à l'EDTA de leur échantillon, ces préparations ne contenaient plus que $0,9 \pm 0,1$ atome de Zn par monomère. Ces résultats indiquent la présence de 2 types de sites métalliques distincts avec une affinité différente pour le Zn (5). Par la suite, la forme inactive ne contenant qu'un seul atome de Zn par sous-unité sera dénommée **apo protéine ou Zn_sFUR_p**.

1.7.6.1 Le site structural à Zn

L'étude de l'apo protéine par spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS) a montré la présence d'un atome de Zn dans un environnement tétracoordonné (66). L'EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) a montré la présence de 2 soufres à une distance de 2,32 Å ainsi que 2 autres atomes pouvant être des azotes ou des oxygènes à 2,05 Å dans la sphère de coordination du Zn. Le XANES (X-ray Absorption Near-Edge Structure) a, quant à lui, indiqué que la géométrie de ce site était tétraédrique.

L'étude de la réactivité des cystéines avec l'iodoacétamide (agent alkylant rajoutant un groupe acétamide) analysée par spectrométrie de masse a permis d'identifier les cystéines impliquées dans la coordination du zinc. En effet, une cinétique d'alkylation plus lente a été observée pour les cystéines 92 et 95 par rapport aux cystéines 132 et 135. En présence d'EDTA, la cinétique d'alkylation est identique pour toutes les cystéines. La protection à l'alkylation des cystéines 92 et 95 a donc été attribuée à la présence du zinc (Figure I.21).

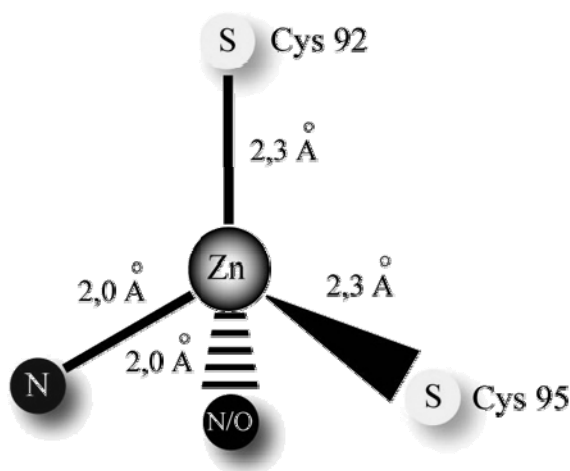


Figure I.21 : Structure proposée pour le site à zinc de FUR d'*E.coli*. Le zinc est tétracoordonné dans une géométrie tétraédrique par deux soufres provenant des cystéines C92 et C95 et par un azote provenant d'une histidine. Le 4^{ème} ligand est un oxygène ou un azote (66).

Ces deux cystéines sont importantes pour l'activité de la protéine puisque des mutants C92S et C95S sont inactifs alors que les mutations des cystéines 132 et 135 sont sans effet (32).

Dans ce travail, nous examinerons plus attentivement le rôle structural de ce site (cf chapitre IV).

1.7.6.2 Le site régulateur

In vitro, les ions Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} sont capables d'activer la protéine et provoquent sa fixation à l'ADN (10, 37). *In vivo*, l'expression du gène *lacZ*, lorsqu'il est placé sous le contrôle de *FUR*, est réprimée en présence de 10 μM de Fe^{2+} , Mn^{2+} ou Co^{2+} dans le milieu de culture (10). La stoechiométrie protéine/métal a été étudiée dans le laboratoire pour les ions Mn^{2+} et Co^{2+} . Ainsi, une stoechiométrie d'un ion Mn^{2+} a été déterminée par la technique de RPE (2).

L'utilisation de différentes spectroscopies (XAS, RPE, EAS) a permis d'établir que les ions, Mn^{2+} et Co^{2+} se fixent dans le même site que le Fe^{2+} (2, 67). L'EXAFS a exclu la présence de soufre dans la sphère de coordination. L'observation des résonances ^1H de *FUR* activée avec du Co^{2+} par RMN a montré des signaux déblindés et échangeables à 30 et 44 ppm appartenant à la gamme des protons N-H du cycle imidazole lorsqu'ils sont liés à un métal (1). Le schéma du site d'activation (Figure I.22) récapitule les informations collectées.

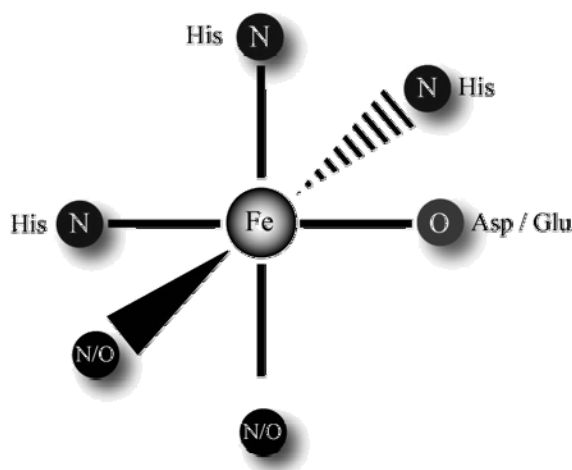


Figure I.22 : Structure proposée du site d'activation de *FUR* occupé par du Fe(II) . L'environnement du fer est intermédiaire entre penta et hexacoordonné dans une géométrie octaédrique. Il comprend 3 azotes dont deux proviendraient d'histidines, un oxygène provenant d'un acide aminé. Les autres atomes sont des oxygènes et/ou des azotes.

Parmi les douze histidines de *FUR* d'*E.coli*, les histidines 32, 86, 87, 89 et 124 sont très conservées mais seules les histidines 32 et 89 sont indispensables à l'activité (14, 32). Ces deux histidines sont donc proposées comme ligands du métal.

Pour nommer les différentes formes de la protéine et le contenu en métal, nous utiliserons la nomenclature suivante tout au long du manuscrit :

$$X_{R/S}FUR_{D/M}$$

où X est le métal, R et S désignent respectivement le site régulateur et le site structural. D et M indique l'état oligomérique de la protéine : D pour dimère et M pour Monomère. Ainsi, $Fe_RZn_SFUR_D$ désigne la forme dimérique contenant du Fe(II) dans le site régulateur et du Zn(II) dans le site structural.

1.7.7 Mécanisme d'activation proposé de la protéine

Lors de son activation par un métal comme le Fe^{2+} , la sensibilité de FUR à la digestion par la trypsine augmente. L'explication avancée était que la liaison du métal entraînait un changement de conformation de la protéine laissant apparaître des régions qui étaient auparavant inaccessibles à la protéase (33). Des expériences d'échange H/D analysées par spectrométrie de masse ont permis de confirmer cette hypothèse. Dans ces expériences, les formes apo FUR et Mn-FUR ont été incubées dans un tampon deutérié avant d'être digérées par une endoprotéase spécifique. Plus une région sera exposée au solvant, plus le taux de deutération sera important. Les résultats de ces expériences ont montré que la reconnaissance du métal entraîne un changement conformationnel avec notamment l'augmentation de l'exposition au solvant de l'hélice d'interaction avec l'ADN (α_4) par rapport à la forme apo (57). Un schéma très simplifié reprend le mécanisme d'activation proposé (Figure I.23)

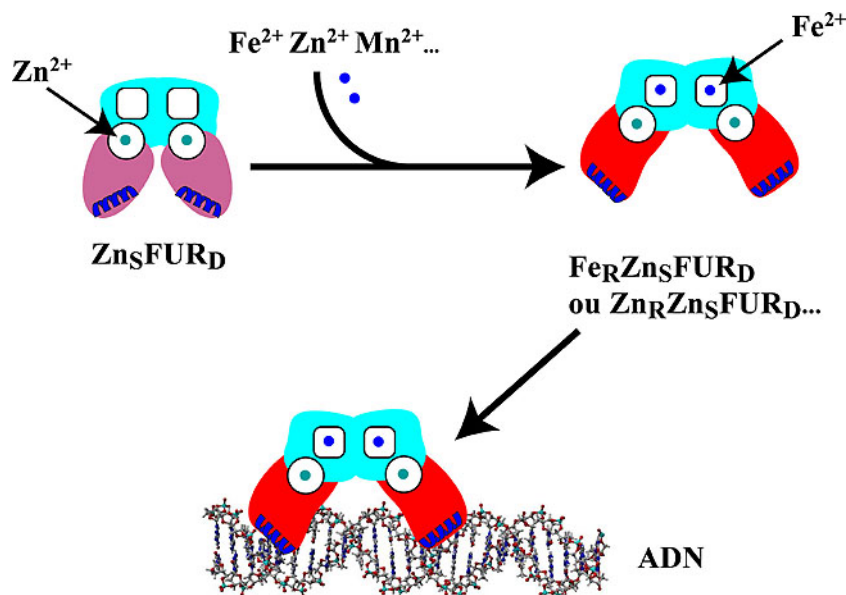


Figure I.23 : Mécanisme schématique d'activation de FUR dimère. Un dimère de FUR contenant 1 atome de zinc par sous unité (Zn_SFUR_D) est activé par la reconnaissance de fer ferreux. La liaison du métal entraîne un changement de conformation avec l'augmentation de l'exposition au solvant d'une partie du domaine N-terminal de FUR (notamment l'hélice de reconnaissance α_R) qui peut alors se lier à sa séquence spécifique d'ADN. Le domaine de liaison à l'ADN est représenté en violet, le domaine de dimérisation en rouge. L'hélice α en bleu correspond à l'hélice d'interaction avec l'ADN.

1.7.8 Interaction protéine / ADN

Comme expliqué un peu plus tôt, lorsque le gène *lacZ* est placé sous le contrôle de FUR, l'expression de ce gène rapporteur est réprimée en présence de Fe(II), de Mn(II) ou de Co(II). Dans cette expérience, le promoteur utilisé correspondait à celui de l'aérobactine. Un site primaire et un site secondaire de fixation de FUR présentant de fortes homologues de séquences ont été identifiés par footprint sur ce promoteur. La comparaison de ces séquences avec celles des promoteurs *fhuA*, *fepA* et *fur* a permis de déduire une séquence consensus palindromique de 19 paires de bases, riche en bases A et T, appelée « iron-box » (44) (Figure I.24).

5' - GATAATGATAATCATTATC - 3'
3' - CTATTACTATTAGTAATAG - 5'

Figure I.24 : Séquence consensus palindromique ou « iron-box » déterminée par Escolar et *al.* (44)

L'insertion d'un oligonucléotide synthétique contenant cette séquence dans un plasmide en amont du gène *lacZ* a permis de confirmer que cette séquence consensus est nécessaire et suffisante *in vivo*, pour fixer la protéine (22).

A ce jour, le mode de fixation de FUR à l'ADN n'est pas connu. Plusieurs modèles sont proposés.

I.7.8.1 **Modèle A : Répétition inversée d'un motif de 9 pb de type « 9-1-9 »**

La nature dimérique de FUR ainsi que la séquence palindromique de l'« iron-box » ont d'abord suggéré un mécanisme de liaison à l'ADN classique avec la fixation d'un dimère par séquence palindromique. Dans ce modèle, chaque sous-unité reconnaît un motif de 9 paires de bases (correspondant à 90% d'un tour d'hélice) séparé de l'autre motif par une paire de base. Dans ce cas, la protéine ne se fixe que sur une seule face de l'ADN (83) avec les hélices de reconnaissance insérées dans 2 grands sillons successifs de l'ADN.

Plusieurs résultats indiquent que ce modèle n'est probablement pas le bon. D'après des expériences d'empreinte par digestion chimique, la protéine FUR "s'enroule" autour de l'ADN. De cette manière, elle occupe plusieurs faces opposées ou adjacentes de la double hélice d'ADN (36). D'autre part, des images de microscopie électronique ont montré un recouvrement de l'ADN par FUR (71) ainsi qu'une véritable polymérisation de la protéine FUR sur l'ADN lorsque le rapport FUR / ADN augmente (50). Un tel phénomène avait déjà été mis en évidence par des expériences d'empreinte à la DNase I sur le

promoteur de l'aérobactine, montrant que l'augmentation du rapport FUR / ADN provoquait la protection de la région en amont de l' « iron box » (43).

I.7.8.2 Modèle B : liaison sur un motif hexamérique

Escolar et *al.* ont proposé que FUR reconnaissait une séquence d'ADN composée de la répétition d'un motif de seulement 6 paires de bases : GATAAT (44, 45). À partir de séquences d'ADN synthétiques, ils ont montré qu'au-delà de trois motifs de base répétés, la région protégée par FUR devenait plus grande.

En analysant la région protégée par la polymérisation de FUR sur le promoteur de l'aérobactine, ils ont confirmé les résultats de leur précédente étude en montrant que celle-ci pouvait être décomposée en une répétition de motifs du type 5'-NAT(A/T)AT-3' (46).

Néanmoins, le motif de 6 paires de bases de ce modèle paraît relativement court. Les études ont montré qu'un ou deux motifs hexamériques adjacents sont insuffisants pour permettre la fixation de FUR. Il a donc été proposé que la formation d'un complexe protéine-ADN stable nécessite des interactions protéine-ADN et protéine-protéine.

I.7.8.3 Modèle C : Répétition d'un motif inversé de type 7-1-7 puis 6-1-6

En 2002, Helmann et *al.* ont proposé que FUR reconnaisse 15 paires de bases selon un motif « 7-1-7 » au lieu de 19 paires de bases chez *B.subtilis*. Dans ce modèle, deux dimères peuvent se fixer sur chaque « boîte fur » sur des faces opposées de la double hélice d'ADN (11). Ce modèle permettrait d'expliquer l'observation faite par De Lorenzo et *al.* en 1988 par rapport à l'enroulement de FUR sur l'ADN.

En accord avec ce modèle, chaque addition consécutive d'un motif de sept paires de base pourrait permettre à un dimère de FUR de se lier. Un modèle similaire a été proposé chez *E.coli* par Lavrarr et *al.* avec toutefois, une petite différence sur la longueur du site de liaison qui est de 13 pb cette fois-ci pour un motif de type « 6-1-6 » (70).

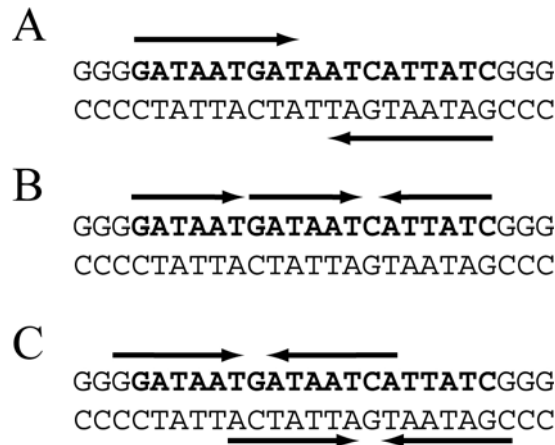


Figure I.25 : Interprétations possibles de la séquence consensus palindromique. Modèle A : la séquence correspond à la répétition inversée d'un motif de 9 pb. Modèle B : la séquence correspond à la répétition d'un motif hexamérique dont deux en sens direct et un inversé. Modèle C : la séquence correspond à la répétition d'un motif de 7 pb avec recouvrement.

I.7.9 Affinité protéine / ADN

La variation du nombre de « boîtes fur » sur chaque promoteur pourrait être à l'origine de différences dans les niveaux de répression. Plus un promoteur possèdera de « boîtes fur », plus la répression du gène sera importante. Une importante diminution de la concentration intracellulaire en fer sera nécessaire pour lever la répression sur ce gène. Les « boîtes fur » les plus utilisées pour la caractérisation de mutants FUR sont celles des régions promotrices des gènes *fhuF* (FhuF, une réductase), *iuc* (opéron impliqué dans la synthèse de l'aérobactine), et *fiu* (récepteur impliqué dans le transport du fer). Les deux premières sont caractérisées comme des « boîtes fur » de moyenne affinité tandis que la dernière est considérée comme une « boîte fur » de forte affinité. Ceci permettrait d'avoir une hiérarchie dans les réponses transcriptionnelles en fonction des changements de concentration en fer dans la cellule (44). Cette hypothèse concorde avec les observations faites sur la capacité de la protéine FUR à polymériser sur l'ADN et ainsi que sur la grande quantité de protéine FUR retrouvée dans une cellule (5000 copies/cellule). Cette quantité peut aller jusqu'à 10000 copies lors d'un stress oxydant (118).

I.7.10 La structure cristallographique de *Pseudomonas aeruginosa* FUR ($Zn_R Zn_S FUR_D$)

En mai 2003, Pohl et al. ont cristallisé la forme métallée par du Zn(II) de *P.aeruginosa* FUR (88). FUR de *Pseudomonas aeruginosa* a 57% d'identité avec FUR d'*E.coli*. La structure obtenue est un dimère de 2*134 résidus contenant une glycine et une sérine supplémentaires à l'extrémité N terminale. La présence de ces résidus est due à la construction utilisée. La protéine sauvage ne permettant pas d'obtenir des cristaux, Pohl et al. ont construit une protéine de fusion avec la GST (fusionnée en N terminal de FUR). Après purification, la GST est clivée par la thrombine mais une glycine et une sérine

supplémentaires restent présentes à l'issue de la protéolyse. Des cristaux ont été obtenus avec cette protéine et ont permis de résoudre sa structure.

Ainsi, FUR de *P.aeruginosa* est constituée de 2 domaines (Figure I.26) :

- Un domaine N terminal (résidus 1 à 84) contenant le motif de liaison à l'ADN de type hélice-coude-hélice ailé. Ce motif contient l'hélice $\alpha 1$ N terminale prédite et l'hélice d'interaction avec l'ADN $\alpha 4$.
- Un domaine C terminal permettant la dimérisation (résidus 85 à 147).

Ces données sont en accord avec les résultats publiés par Stojiljkovic et al en 1995 identifiant les domaines fonctionnels de FUR d'*E.coli* (104).

L'interface de dimérisation est constituée d'un long feuillet β antiparallèle (12 résidus) regroupant les brins $\beta 5/\beta 5'$ et des hélices $\alpha 5/\alpha 5'$. Cette interface est stabilisée par l'interaction de résidus hydrophobes qui sont conservés dans les différents organismes au sein de $\beta 5$ et $\alpha 5$. Ces résidus sont le motif LYLY de $\beta 5$ ainsi que I113 de $\alpha 5$.

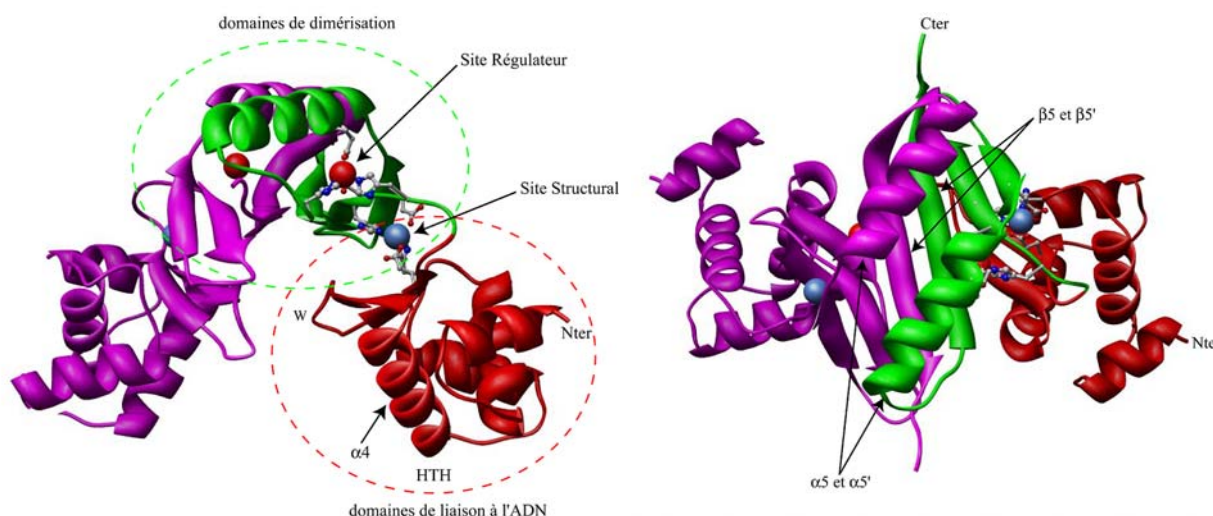


Figure I.26 : Structure cristallographique du dimère de *Pseudomonas aeruginosa* FUR ayant incorporée du zinc dans le site régulateur ($Zn_R Zn_S FUR_D$). Une sous-unité est représentée en magenta. Dans l'autre sous-unité, le domaine de liaison à l'ADN (en rouge) est constitué d'un motif hélice-coude-hélice ailé dans lequel $\alpha 4$ est l'hélice d'interaction avec l'ADN. Le domaine de dimérisation (en vert) est formé d'un long brin bêta ($\beta 5$) et d'une hélice ($\alpha 5$) à l'origine des interactions inter-sous unité. Le zinc du site structural est représenté en bleu et celui du site régulateur en rouge.

Les sites métalliques de *P.aeruginosa* FUR ont été identifiés par XAS (X-ray Absorption Spectroscopy) en dialysant la protéine purifiée contre du tampon contenant du Fe(II) (Figure I.27). Cette technique a permis d'identifier la présence de Zn(II) et de Fe(II) dans l'échantillon. Comme le Zn(II) n'a pas été utilisé durant la purification, les auteurs en ont déduit qu'il existe un site à zinc déjà occupé dans

la protéine. De plus, le zinc ne pouvant pas être échangé par du Fe(II) lors de la dialyse, les auteurs ont conclu qu'il s'agit d'un site de haute affinité pour le Zn(II) et donc que le Zn(II) observé est vraisemblablement dans le site structural. Le XANES a indiqué que ce site était tétraédrique ce qui appuie l'identification de ce site comme le site structural à zinc.

D'après les données XANES et EXAFS, le site contenant le Fe(II) contient 5 ou 6 ligands de type N/O. Ces données sont en accord avec les résultats publiés des différentes spectroscopies sur FUR d'*E.coli* (2, 67). Les auteurs en ont donc déduit qu'il s'agit du site régulateur.

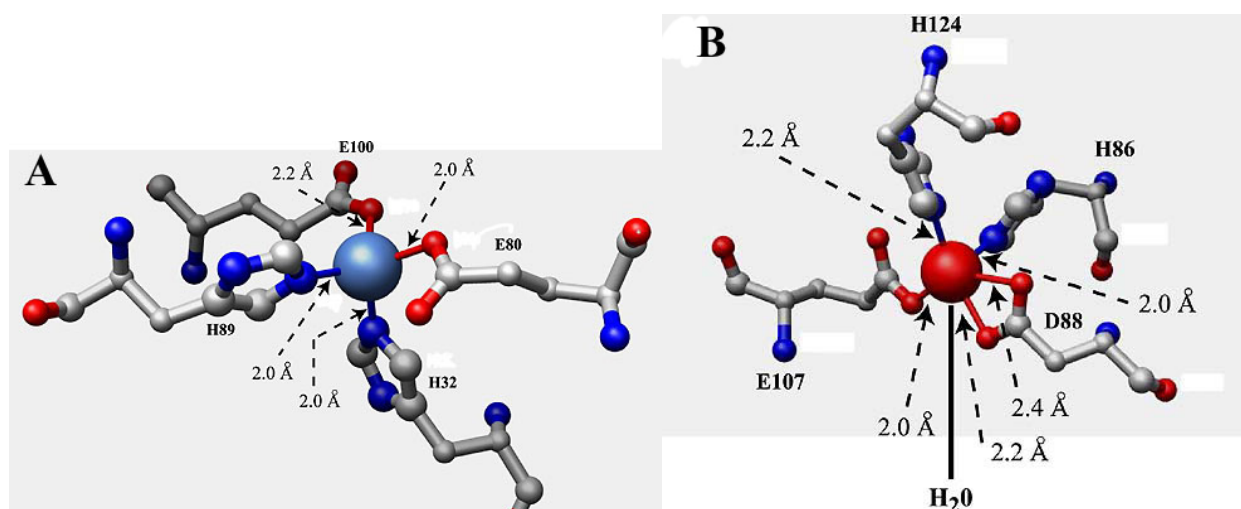


Figure I.27 : Sites métalliques de *P.aeruginosa* FUR d'après la structure cristallographique et les données XAS. A) Site structural B) Site régulateur

I.8 Bilan des comparaisons structurales des cinq familles de métallorégulateurs

Nous venons de voir les principales propriétés des différentes familles de métallos-régulateurs. Certaines de ces propriétés sont résumées dans le Tableau I.6. Il est intéressant de noter les points communs et les différences entre ces familles. Toutes, exceptée NikR possèdent un motif de liaison à l'ADN de type hélice-coude-hélice ailé. Les motifs du type HTH et W-HTH sont très courants aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. (9). Un motif W-HTH presque identique est retrouvé dans la famille DtxR et la famille FUR. Pour toutes, exceptée NikR, ce sont des formes dimériques qui interagissent avec l'ADN. Cependant, ce ne sont pas toujours les formes métallées qui se lient à l'ADN. La liaison du métal entraîne des changements de conformation qui peuvent paraître subtils mais ceux-ci semblent amplifiés et transmis par des réseaux de liaisons hydrogènes du site métallique aux zones d'interaction avec l'ADN. Il est clair que les propriétés de FUR, parmi toutes ces données, se rapprochent

plus de celles de DtxR en ce qui concerne le mode d'activation par le métal. Cependant les différences entre les membres de ces deux familles au niveau en particulier du domaine de dimérisation ne permettent pas de répondre à toutes les questions qui restent posées concernant la structure des protéines de la famille FUR.

Famille	Motif d'interaction avec l'ADN	Forme se liant à l'ADN	Mode de régulation par l'ion métallique
SmtB	Hélice coude hélice ailé	dimère	Apo : répresseur Métallée : faible affinité
MerR	Hélice coude hélice ailé	dimère	Apo : répresseur Métallée : activateur
DtxR	Hélice coude hélice ailé	dimère	Apo : pas d'affinité Métallée : répresseur
FUR	Hélice coude hélice ailé	dimère	Apo : pas d'affinité Métallée : répresseur
NikR	Ruban-hélice-hélice	tétramère	Apo : pas d'affinité Métallée : répresseur

Tableau I.6 : Les différents métallos-régulateurs, leur forme active et leur propriété d'interaction avec l'ADN en fonction de leur état de métallation.

I.9 Présentation du travail.

Au début de ce travail, aucune structure tridimensionnelle de protéine FUR n'était connue. Cette protéine qui est un régulateur global essentiel à la viabilité de la bactérie, existant dans toutes les bactéries Gram négatives, peut être une cible de choix dans l'élaboration de nouveaux antibiotiques, les maladies nosocomiales constituant un réel problème de santé publique. Dans cette optique, la structure tridimensionnelle est une donnée importante pouvant permettre de mieux connaître le fonctionnement de cette protéine afin d'élaborer par exemple de nouveaux médicaments.

Le but du travail qui vous sera présenté dans ce manuscrit était donc de déterminer la structure par RMN de la protéine Zn_5FUR_D d'*E.coli*. Suite à la sortie de la structure de $Zn_5Zn_RFUR_D$ de *P.aeruginosa*, nous avons réorienté le travail vers l'étude du passage monomère/dimère d'un point de vue structural afin de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la dimérisation de FUR à partir d'une forme monomérique obtenue à l'issue de la purification. Enfin, nous nous sommes intéressés à la comparaison de l'activité de liaison à l'ADN des formes dimériques et monomériques de FUR d'*E.coli*.

La caractérisation structurale par RMN de cette forme dimère sera décrite dans le chapitre III. De plus, l'existence d'une forme monomère de FUR, mise en évidence au laboratoire PMB, nous a incité à étudier sa structure en solution ainsi que le processus de sa dimérisation. Le chapitre IV décrira les

résultats de cette étude. Ensuite, l'analyse des changements structuraux de ces deux formes après activation par un ion métallique sera présentée dans le chapitre V. Le chapitre VI décrira le comportement de ces deux formes vis-à-vis de la liaison à l'ADN en particulier grâce à des études réalisées par anisotropie de fluorescence. Enfin le chapitre VII discutera l'ensemble des résultats pour conclure sur ce travail.

Références bibliographiques

1. Adrait A. 1998. *Etudes spectroscopiques et magnétiques de la protéine FUR (Ferric Uptake Regulation) d'Escherichia coli*. Joseph Fourier, Grenoble
2. Adrait A, Jacquamet L, Le Pape L, Gonzalez de Peredo A, Aberdam D, et al. 1999. Spectroscopic and saturation magnetization properties of the manganese- and cobalt-substituted Fur (ferric uptake regulation) protein from Escherichia coli. *Biochemistry* 38: 6248
3. Ahmed M, Borsch CM, Taylor SS, Vazquez-Laslop N, Neyfakh AA. 1994. A protein that activates expression of a multidrug efflux transporter upon binding the transporter substrates. *J Biol Chem* 269: 28506
4. Ahmed M, Lyass L, Markham PN, Taylor SS, Vazquez-Laslop N, Neyfakh AA. 1995. Two highly similar multidrug transporters of Bacillus subtilis whose expression is differentially regulated. *J Bacteriol* 177: 3904
5. Althaus EW, Outten CE, Olson KE, Cao H, O'Halloran TV. 1999. The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* 38: 6559
6. Amabile-Cuevas CF, Dimple B. 1991. Molecular characterization of the soxRS genes of Escherichia coli: two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic Acids Res* 19: 4479
7. Andrews SC, Robinson AK, Rodriguez-Quinones F. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27: 215
8. Ansari AZ, Bradner JE, O'Halloran TV. 1995. DNA-bend modulation in a repressor-to-activator switching mechanism. *Nature* 374: 371
9. Aravind L, Anantharaman V, Balaji S, Babu MM, Iyer LM. 2005. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev* 29: 231
10. Bagg A, Neilands JB. 1987. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in Escherichia coli. *Biochemistry* 26: 5471
11. Baichoo N, Helmann JD. 2002. Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* 184: 5826
12. Bloom SL, Zamble DB. 2004. Metal-selective DNA-binding response of Escherichia coli NikR. *Biochemistry* 43: 10029
13. Boland CA, Meijer WG. 2000. The iron dependent regulatory protein IdeR (DtxR) of Rhodococcus equi. *FEMS Microbiol Lett* 191: 1
14. Braun V, Schäffer S, Hantke K, Tröger W. 1990. Regulation of Gene Expression by Iron. In *The Molecular Basis of Bacterial Metabolism. Colloquium Mosbach 1990*, pp. 165. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
15. Brocklehurst KR, Hobman JL, Lawley B, Blank L, Marshall SJ, et al. 1999. ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of zntA in Escherichia coli. *Mol Microbiol* 31: 893
16. Brown NL, Stoyanov JV, Kidd SP, Hobman JL. 2003. The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev* 27: 145

17. Bsat N, Chen L, Helmann JD. 1996. Mutation of the *Bacillus subtilis* alkyl hydroperoxide reductase (ahpCF) operon reveals compensatory interactions among hydrogen peroxide stress genes. *J Bacteriol* 178: 6579
18. Bsat N, Herbig A, Casillas-Martinez L, Setlow P, Helmann JD. 1998. *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol Microbiol* 29: 189
19. Busenlehner LS, Cosper NJ, Scott RA, Rosen BP, Wong MD, Giedroc DP. 2001. Spectroscopic properties of the metalloregulatory Cd(II) and Pb(II) sites of *S. aureus* pI258 CadC. *Biochemistry* 40: 4426
20. Busenlehner LS, Pennella MA, Giedroc DP. 2003. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: Structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 27: 131
21. Busenlehner LS, Weng TC, Penner-Hahn JE, Giedroc DP. 2002. Elucidation of primary ($\alpha(3)N$) and vestigial ($\alpha(5)$) heavy metal-binding sites in *Staphylococcus aureus* pI258 CadC: evolutionary implications for metal ion selectivity of ArsR/SmtB metal sensor proteins. *J Mol Biol* 319: 685
22. Calderwood SB, Mekalanos JL. 1988. Confirmation of the Fur Operator Site by insertion of a synthetic Oligonucleotide into an Operon Fusion Plasmid. *J. Bacteriol.* 170: 1015
23. Carrington PE, Chivers PT, Al-Mjeni F, Sauer RT, Maroney MJ. 2003. Nickel coordination is regulated by the DNA-bound state of NikR. *Nat Struct Biol* 10: 126
24. Cavet JS, Meng W, Pennella MA, Appelhoff RJ, Giedroc DP, Robinson NJ. 2002. A nickel-cobalt-sensing ArsR-SmtB family repressor. Contributions of cytosol and effector binding sites to metal selectivity. *J Biol Chem* 277: 38441
25. Changela A, Chen K, Xue Y, Holschen J, Outten CE, et al. 2003. Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science* 301: 1383
26. Chen CS, White A, Love J, Murphy JR, Ringe D. 2000. Methyl groups of thymine bases are important for nucleic acid recognition by DtxR. *Biochemistry* 39: 10397
27. Chivers PT, Sauer RT. 2000. Regulation of high affinity nickel uptake in bacteria. Ni^{2+} -Dependent interaction of NikR with wild-type and mutant operator sites. *J Biol Chem* 275: 19735
28. Chivers PT, Sauer RT. 2002. NikR repressor: high-affinity nickel binding to the C-terminal domain regulates binding to operator DNA. *Chem Biol* 9: 1141
29. Chivers PT, Tahirov TH. 2005. Structure of *Pyrococcus horikoshii* NikR: nickel sensing and implications for the regulation of DNA recognition. *J Mol Biol* 348: 597
30. Chou CJ, Wisedchaisri G, Monfeli RR, Oram DM, Holmes RK, et al. 2004. Functional studies of the *Mycobacterium tuberculosis* iron-dependent regulator. *J Biol Chem* 279: 53554
31. Cook WJ, Kar SR, Taylor KB, Hall LM. 1998. Crystal structure of the cyanobacterial metallothionein repressor SmtB: a model for metalloregulatory proteins. *J Mol Biol* 275: 337
32. Coy M, Doyle C, Besser J, Neilands JB. 1994. Site-directed mutagenesis of the ferric uptake regulation gene of *Escherichia coli*. *Biometals* 7: 292
33. Coy M, Neilands JB. 1991. Structural dynamics and functional domains of the fur protein. *Biochemistry* 30: 8201

34. Cuff JA, Clamp M, Siddiqui AS, Finlay M, Barton GJ. 1998. J-Pred: a consensus secondary structure prediction server. *Bioinformatics* 14: 892
35. D'Autréaux B. 2002. *Etudes spectroscopiques de la protéine FUR (Ferric Uptake Regulation). Interaction avec le monoxyde d'azote*. Scientific thesis. UJF, Grenoble
36. de Lorenzo V, Giovannini F, Herrero M, Neilands JB. 1988. Metal ion regulation of gene expression. Fur repressor-operator interaction at the promoter region of the aerobactin system of pColV-K30. *J Mol Biol* 203: 875
37. de Lorenzo V, Wee S, Herrero M, Neilands JB. 1987. Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (fur) repressor. *J Bacteriol* 169: 2624
38. De Pina K, Desjardin V, Mandrand-Berthelot MA, Giordano G, Wu LF. 1999. Isolation and characterization of the nikR gene encoding a nickel-responsive regulator in Escherichia coli. *J Bacteriol* 181: 670
39. Edgcomb SP, Murphy KP. 2002. Variability in the pKa of histidine side-chains correlates with burial within proteins. *Proteins* 49: 1
40. Eicken C, Pennella MA, Chen X, Koshlap KM, VanZile ML, et al. 2003. A metal-ligand-mediated intersubunit allosteric switch in related SmtB/ArsR zinc sensor proteins. *J Mol Biol* 333: 683
41. Erbe JL, Taylor KB, Hall LM. 1995. Metalloregulation of the cyanobacterial smt locus: identification of SmtB binding sites and direct interaction with metals. *Nucleic Acids Res* 23: 2472
42. Ernst JF, Bennett RL, Rothfield LI. 1978. Constitutive expression of the iron-enterochelin and ferrichrome uptake systems in a mutant strain of Salmonella typhimurium. *J Bacteriol* 135: 928
43. Escolar L, de Lorenzo V, Perez-Martin J. 1997. Metalloregulation in vitro of the aerobactin promoter of Escherichia coli by the Fur (ferric uptake regulation) protein. *Mol Microbiol* 26: 799
44. Escolar L, Perez-Martin J, de Lorenzo V. 1998. Binding of the fur (ferric uptake regulator) repressor of Escherichia coli to arrays of the GATAAT sequence. *J Mol Biol* 283: 537
45. Escolar L, Perez-Martin J, de Lorenzo V. 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* 181: 6223
46. Escolar L, Perez-Martin J, de Lorenzo V. 2000. Evidence of an unusually long operator for the fur repressor in the aerobactin promoter of Escherichia coli. *J Biol Chem* 275: 24709
47. Feese MD, Ingason BP, Goranson-Siekierke J, Holmes RK, Hol WG. 2001. Crystal structure of the iron-dependent regulator from Mycobacterium tuberculosis at 2.0-A resolution reveals the Src homology domain 3-like fold and metal binding function of the third domain. *J Biol Chem* 276: 5959
48. Finney LA, O'Halloran TV. 2003. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* 300: 931
49. Fourel G, Phalipon A, Kaczorek M. 1989. Evidence for direct regulation of diphtheria toxin gene transcription by an Fe²⁺-dependent DNA-binding repressor, DtoxR, in Corynebacterium diphtheriae. *Infect Immun* 57: 3221

50. Frechon D, Le Cam E. 1994. Fur (ferric uptake regulation) protein interaction with target DNA: comparison of gel retardation, footprinting and electron microscopy analyses. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 346
51. Fuentes AM, Diaz-Mejia JJ, Maldonado-Rodriguez R, Amabile-Cuevas CF. 2001. Differential activities of the SoxR protein of *Escherichia coli*: SoxS is not required for gene activation under iron deprivation. *FEMS Microbiol Lett* 201: 271
52. Gaballa A, Helmann JD. 1998. Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 180: 5815
53. Garibaldi JA, Neilands JB. 1956. Formation of iron-binding compounds by micro-organisms. *Nature* 177: 526
54. Glasfeld A, Guedon E, Helmann JD, Brennan RG. 2003. Structure of the manganese-bound manganese transport regulator of *Bacillus subtilis*. *Nat Struct Biol* 10: 652
55. Golynskiy MV, Davis TC, Helmann JD, Cohen SM. 2005. Metal-induced structural organization and stabilization of the metalloregulatory protein MntR. *Biochemistry* 44: 3380
56. Gonzalez de Peredo A. 2000. *Etude structurale de la protéine FUR (Ferric Uptake Regulation) d'Escherichia coli par spectrométrie de masse*
57. Gonzalez de Peredo A, Saint-Pierre C, Latour JM, Michaud-Soret I, Forest E. 2001. Conformational changes of the ferric uptake regulation protein upon metal activation and DNA binding; first evidence of structural homologies with the diphtheria toxin repressor. *J Mol Biol* 310: 83
58. Hahn JS, Oh SY, Roe JH. 2000. Regulation of the furA and catC operon, encoding a ferric uptake regulator homologue and catalase-peroxidase, respectively, in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 182: 3767
59. Hantke K. 1981. Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet* 182: 288
60. Hantke K. 1984. Cloning of the repressor protein gene of iron-regulated systems in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* 197: 337
61. Hantke K. 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4: 172
62. Heldwein EE, Brennan RG. 2001. Crystal structure of the transcription activator BmrR bound to DNA and a drug. *Nature* 409: 378
63. Hidalgo E, Leautaud V, Dimple B. 1998. The redox-regulated SoxR protein acts from a single DNA site as a repressor and an allosteric activator. *Embo J* 17: 2629
64. Holm L, Sander C, Ruterjans H, Schnarr M, Fogh R, et al. 1994. LexA repressor and iron uptake regulator from *Escherichia coli*: new members of the CAP-like DNA binding domain superfamily. *Protein Eng* 7: 1449
65. Huckle JW, Morby AP, Turner JS, Robinson NJ. 1993. Isolation of a prokaryotic metallothionein locus and analysis of transcriptional control by trace metal ions. *Mol Microbiol* 7: 177
66. Jacquamet L, Aberdam D, Adrait A, Hazemann JL, Latour JM, Michaud-Soret I. 1998. X-ray Absorption Spectroscopy of a New Zinc Site in the Fur Protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 37: 2564

67. Jacquamet L, Dole F, Jeandey C, Oddou JL, Perret E, et al. 2000. First spectroscopic characterization of Fe(II)-Fur, the physiological active form of the Fur protein. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 394
68. Kar SR, Adams AC, Lebowitz J, Taylor KB, Hall LM. 1997. The cyanobacterial repressor SmtB is predominantly a dimer and binds two Zn²⁺ ions per subunit. *Biochemistry* 36: 15343
69. Khan S, Brocklehurst KR, Jones GW, Morby AP. 2002. The functional analysis of directed amino-acid alterations in ZntR from Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Commun* 299: 438
70. Lavrarr JL, Christoffersen CA, McIntosh MA. 2002. Fur-DNA interactions at the bidirectional fepDGC-entS promoter region in Escherichia coli. *J Mol Biol* 322: 983
71. Le Cam E, Frechon D, Barray M, Fourcade A, Delain E. 1994. Observation of binding and polymerization of Fur repressor onto operator-containing DNA with electron and atomic force microscopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11816
72. Lippard SJ, Berg JM. 1994. *Principles of Bioinorganic Chemistry*
73. McCall KA, Huang C, Fierke CA. 2000. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr* 130: 1437S
74. Michaud-Soret I, Adrait A, Jaquinod M, Forest E, Touati D, Latour JM. 1997. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis of the Apo- and Metal- Substituted Forms of the FUR Protein. *FEBS Letters* 413: 473
75. Moore CM, Helmann JD. 2005. Metal ion homeostasis in Bacillus subtilis. *Curr Opin Microbiol* 8: 188
76. Morby AP, Turner JS, Huckle JW, Robinson NJ. 1993. SmtB is a metal-dependent repressor of the cyanobacterial metallothionein gene smtA: identification of a Zn inhibited DNA-protein complex. *Nucleic Acids Res* 21: 921
77. Morton CJ, Campbell ID. 1994. SH3 domains. Molecular 'Velcro'. *Curr Biol* 4: 615
78. Newberry KJ, Brennan RG. 2004. The structural mechanism for transcription activation by MerR family member multidrug transporter activation, N terminus. *J Biol Chem* 279: 20356
79. O'Halloran T, Walsh C. 1987. Metalloregulatory DNA-binding protein encoded by the merR gene: isolation and characterization. *Science* 235: 211
80. Ortiz de Orue Lucana D, Schrempf H. 2000. The DNA-binding characteristics of the Streptomyces reticuli regulator FurS depend on the redox state of its cysteine residues. *Mol Gen Genet* 264: 341
81. Outten CE, Outten FW, O'Halloran TV. 1999. DNA distortion mechanism for transcriptional activation by ZntR, a Zn(II)-responsive MerR homologue in Escherichia coli. *J Biol Chem* 274: 37517
82. Outten FW, Outten CE, Hale J, O'Halloran TV. 2000. Transcriptional activation of an Escherichia coli copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, cueR. *J Biol Chem* 275: 31024
83. Pabo CO, Sauer RT. 1992. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 61: 1053
84. Pappenheimer AM, Jr. 1977. Diphtheria toxin. *Annu Rev Biochem* 46: 69

85. Patzer SI, Hantke K. 1998. The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 28: 1199
86. Pennella MA, Giedroc DP. 2005. Structural Determinants of Metal Selectivity in Prokaryotic Metal-responsive Transcriptional Regulators. *Biometals* 18: 413
87. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, et al. 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25: 1605
88. Pohl E, Haller JC, Mijovilovich A, Meyer-Klaucke W, Garman E, Vasil ML. 2003. Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* 47: 903
89. Pohl E, Holmes RK, Hol WG. 1998. Motion of the DNA-binding domain with respect to the core of the diphtheria toxin repressor (DtxR) revealed in the crystal structures of apo- and holo-DtxR. *J Biol Chem* 273: 22420
90. Pohl E, Holmes RK, Hol WG. 1999. Crystal structure of a cobalt-activated diphtheria toxin repressor-DNA complex reveals a metal-binding SH3-like domain. *J Mol Biol* 292: 653
91. Pohl E, Holmes RK, Hol WG. 1999. Crystal structure of the iron-dependent regulator (IdeR) from *Mycobacterium tuberculosis* shows both metal binding sites fully occupied. *J Mol Biol* 285: 1145
92. Posey JE, Hardham JM, Norris SJ, Gherardini FC. 1999. Characterization of a manganese-dependent regulatory protein, TroR, from *Treponema pallidum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10887
93. Prince RW, Cox CD, Vasil ML. 1993. Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa* fur gene. *J Bacteriol* 175: 2589
94. Rees DC. 2002. Great metallocusters in enzymology. *Annu Rev Biochem* 71: 221
95. Saito T, Wormald MR, Williams RPJ. 1991. Some structural features of the iron-uptake regulation protein. *European Journal of Biochemistry* 197: 29
96. Schaffer S, Hantke K, Braun V. 1985. Nucleotide sequence of the iron regulatory gene fur. *Mol Gen Genet* 200: 110
97. Schmitt MP. 2002. Analysis of a DtxR-like metalloregulatory protein, MntR, from *Corynebacterium diphtheriae* that controls expression of an ABC metal transporter by an Mn(2+)-dependent mechanism. *J Bacteriol* 184: 6882
98. Schmitt MP, Predich M, Doukhan L, Smith I, Holmes RK. 1995. Characterization of an iron-dependent regulatory protein (IdeR) of *Mycobacterium tuberculosis* as a functional homolog of the diphtheria toxin repressor (DtxR) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Infect Immun* 63: 4284
99. Schreiter ER, Sintchak MD, Guo Y, Chivers PT, Sauer RT, Drennan CL. 2003. Crystal structure of the nickel-responsive transcription factor NikR. *Nat Struct Biol* 10: 794
100. Shi W, Dong J, Scott RA, Ksenzenko MY, Rosen BP. 1996. The role of arsenic-thiol interactions in metalloregulation of the ars operon. *J Biol Chem* 271: 9291
101. Shi W, Wu J, Rosen BP. 1994. Identification of a putative metal binding site in a new family of metalloregulatory proteins. *J Biol Chem* 269: 19826

102. Spiering MM, Ringe D, Murphy JR, Marletta MA. 2003. Metal stoichiometry and functional studies of the diphtheria toxin repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3808
103. Staggs TM, Perry RD. 1991. Identification and cloning of a fur regulatory gene in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* 173: 417
104. Stojiljkovic I, Hantke K. 1995. Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol Gen Genet* 247: 199
105. Stoyanov JV, Brown NL. 2003. The *Escherichia coli* copper-responsive copA promoter is activated by gold. *J Biol Chem* 278: 1407
106. Stoyanov JV, Hobman JL, Brown NL. 2001. CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Mol Microbiol* 39: 502
107. Summers AO. 1992. Untwist and shout: a heavy metal-responsive transcriptional regulator. *J Bacteriol* 174: 3097
108. Thelwell C, Robinson NJ, Turner-Cavet JS. 1998. An SmtB-like repressor from *Synechocystis* PCC 6803 regulates a zinc exporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10728
109. VanZile ML, Chen X, Giedroc DP. 2002. Allosteric negative regulation of smt O/P binding of the zinc sensor, SmtB, by metal ions: a coupled equilibrium analysis. *Biochemistry* 41: 9776
110. VanZile ML, Chen X, Giedroc DP. 2002. Structural characterization of distinct alpha3N and alpha5 metal sites in the cyanobacterial zinc sensor SmtB. *Biochemistry* 41: 9765
111. Wang G, Wylie GP, Twigg PD, Caspar DL, Murphy JR, Logan TM. 1999. Solution structure and peptide binding studies of the C-terminal src homology 3-like domain of the diphtheria toxin repressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6119
112. Wang SC, Dias AV, Bloom SL, Zamble DB. 2004. Selectivity of metal binding and metal-induced stability of *Escherichia coli* NikR. *Biochemistry* 43: 10018
113. White A, Ding X, vanderSpek JC, Murphy JR, Ringe D. 1998. Structure of the metal-ion-activated diphtheria toxin repressor/tox operator complex. *Nature* 394: 502
114. Williams RJP, Wormald MR, Hider RC, Neilands JB. 1989. Spectroscopic properties of the FUR (Ferric Uptake Regulation) protein of *Escherichia coli* K-12. In *Metal Ion Homeostasis: Molecular Biology and Chemistry*, pp. 189: Alan R. Liss, Inc.
115. Wisedchaisri G, Holmes RK, Hol WG. 2004. Crystal structure of an IdeR-DNA complex reveals a conformational change in activated IdeR for base-specific interactions. *J Mol Biol* 342: 1155
116. Wong MD, Lin YF, Rosen BP. 2002. The soft metal ion binding sites in the *Staphylococcus aureus* pI258 CadC Cd(II)/Pb(II)/Zn(II)-responsive repressor are formed between subunits of the homodimer. *J Biol Chem* 277: 40930
117. Wu J, Rosen BP. 1993. Metalloregulated expression of the ars operon. *J Biol Chem* 268: 52
118. Zheng M, Doan B, Schneider TD, Storz G. 1999. OxyR and SoxRS regulation of fur. *J Bacteriol* 181: 4639
119. Zou P, Borovok I, Ortiz de Orue Lucana D, Muller D, Schrempf H. 1999. The mycelium-associated *Streptomyces reticuli* catalase-peroxidase, its gene and regulation by FurS. *Microbiology* 145 (Pt 3): 549

Chapitre II

Etude structurale d'une protéine par

Résonance Magnétique Nucléaire

Rappels Bibliographiques

De nos jours, seules deux techniques permettent de déterminer la structure des macromolécules biologiques à une résolution de l'ordre de l'angström (Å).

La première est la cristallographie des rayons X. Cette technique nécessite l'obtention de cristaux de protéines et se base sur la diffraction des rayons X par les atomes formant les protéines. La première structure de protéine résolue par cette technique fut la myoglobine en 1958 (23). Depuis, avec les progrès technologiques (sources synchrotron, robots de cristallisation), le nombre de structures résolues par cristallographie n'a cessé d'augmenter et à ce jour, plus de 25 000 structures de protéines, de virus et de peptides sont déposées dans la banque de données PDB (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb>).

La seconde technique, dont le développement en biologie structurale est plus récent avec la première structure de protéine résolue en 1985 (54), est la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Elle se base sur les propriétés magnétiques du spin nucléaire.

Lorsque des molécules sont placées dans un champ magnétique intense \mathbf{B}_0 , les niveaux d'énergie des noyaux possédant un spin nucléaire ne sont plus dégénérés et se séparent. Une faible majorité des spins va s'orienter parallèlement au champ magnétique. Les spins vont précesser autour du champ magnétique à une vitesse angulaire ω_0 appelée fréquence de Larmor.

L'expérience RMN consiste à exciter les noyaux par des impulsions radiofréquences. Ces impulsions vont rompre l'équilibre et modifier les populations des niveaux d'énergie. Cette excitation permet de modifier l'orientation de l'aimantation macroscopique qui passe d'une orientation parallèle au champ magnétique (à l'équilibre) vers une orientation perpendiculaire au même champ. La précession des spins va générer un courant détectable par une bobine. Ce signal correspond à une sinusoïde amortie dans le temps et est appelé FID (Free Induction Decay). Il est analysé par transformée de Fourier. Cette opération permet de passer du domaine temporel au domaine des fréquences. Chaque fréquence est caractéristique d'un noyau et va permettre son identification (attribution).

Après attribution, la corrélation des paires de noyaux va fournir des **informations structurales** mais également **dynamiques**. La RMN permet également d'étudier **les interactions intermoléculaires** et le repliement des protéines (34, 36, 53).

A ce jour, plus de 3800 structures de molécules (protéines et peptides) ont été résolues par RMN (<http://www.rcsb.org/pdb/holdings.html>) mais la limitation majeure de cette technique est la taille des molécules étudiées. En effet, bien que l'attribution ainsi que le repliement global d'une molécule de 753 résidus (malate synthase G) ait été faite par RMN (46-49), la taille limite actuelle pour une étude classique est aux alentours de 40 kDa. (13)

II.1 La RMN : limites et progrès technologiques

De nombreuses conditions doivent être remplies avant de commencer l'étude d'une macromolécule par RMN. Celle-ci doit être **soluble**, **stable à forte concentration** et sa **masse moléculaire** ne doit pas être trop importante sous peine d'avoir des signaux dont la qualité sera altérée par des phénomènes physiques.

Pour éviter ces problèmes, certaines propriétés techniques doivent être prises en compte.

II.1.1 Limites imposées par la technique et l'échantillon biologique

Le rapport signal sur bruit (S/N) d'une expérience est proportionnel aux paramètres suivants :

$$\frac{S}{N} \propto N_{\text{mlc}} A T^{-1} B_0^{3/2} \gamma_{\text{exc}} \gamma_{\text{obs}}^{3/2} T_2^* \sqrt{N_{\text{scans}}}$$

où N_{mlc} est le nombre de molécules dans le volume d'observation, A représente l'abondance des spins actifs, T la température, B_0 le champ magnétique statique, γ_{exc} et γ_{obs} les rapports gyromagnétiques des spins initialement excités et observés, T_2^* la relaxation transversale et N_{scans} le nombre de scans.

Cette relation montre que la sensibilité augmente avec l'intensité du champ magnétique (en $B_0^{3/2}$) et l'augmentation du nombre de spins ($N_{\text{mlc}} * A$).

Dans un champ magnétique, la différence de population des niveaux d'énergie des spins est très faible (de l'ordre de 1,4 pour 10 000 spins à 18,8 Tesla). La RMN n'est donc pas une technique très sensible et nécessite l'utilisation d'échantillons concentrés (>0,5 mM) et stables (pas de phénomènes d'oligomérisation, pas de dégradation) car l'enregistrement des différentes expériences peut durer plusieurs semaines.

La taille de la molécule est également un paramètre important. En effet, la gamme des déplacements chimiques des différents atomes détectables est constante : 12 ppm pour le proton, 30 ppm pour l'azote et le carbone α . Comme le nombre de signaux observables augmente bien plus vite que le nombre de résidus, le nombre de superpositions des pics de corrélation est de plus en plus important lorsque la taille de la protéine augmente. Ceci entraîne une **diminution de la résolution** et des difficultés d'interprétation des spectres de par l'augmentation du nombre de systèmes de spins attribués de manière ambiguë (Figure II.1).

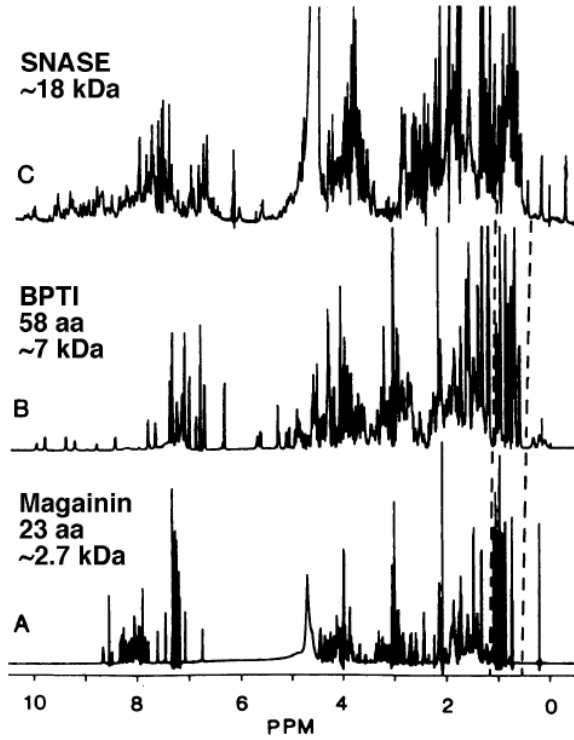


Figure II.1 : Spectre 1D ^1H de 3 protéines de tailles différentes. L'augmentation du nombre de résidus entraîne une augmentation des superpositions sur le spectre.

Un autre problème inhérent à la taille de la molécule est la largeur de raie. Un pic de résonance est une fonction lorentzienne et peut s'écrire de la manière suivante :

$$f(\nu) = \frac{1/R_2}{1 + 4\pi^2(1/R_2)^2(\nu - \nu_0)^2}$$

où $f(\nu)$ correspond à l'intensité du pic à la fréquence ν , R_2 à la vitesse de relaxation transversale ($R_2 = 1/T_2^*$) et ν_0 représente la fréquence correspondant au maximum d'intensité du pic. On peut facilement montrer que la largeur de raie à mi hauteur $\Delta\nu$ est proportionnelle au temps de relaxation transversale T_2^* (* indique que l'on tient compte de l'inhomogénéité du champ) :

$$\Delta\nu = \frac{R_2}{\pi} = \frac{1}{\pi T_2^*}$$

Comme T_2 est dépendant du temps de corrélation τ_c lui même proportionnel à la taille de la molécule, il en résulte que la largeur des signaux augmente avec la taille de la molécule (Figure II.2).

$$\tau_c = \frac{\eta V}{kT}$$

Avec η : viscosité du milieu, k : constante de Boltzmann, T : température et V : volume de la molécule directement dépendant de sa taille.

En conséquence, la **sensibilité** et la **résolution** d'une expérience **seront diminuées** avec **l'augmentation de la taille de la molécule étudiée**.

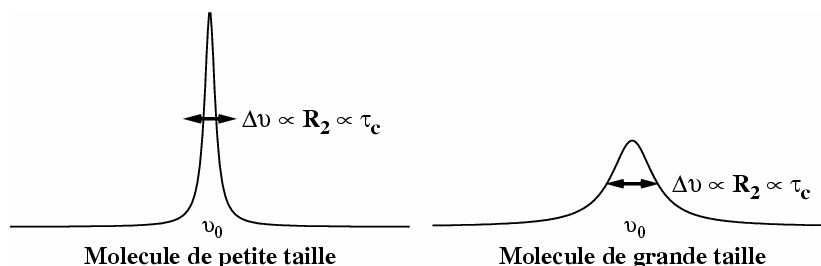


Figure II.2 : Comparaison du signal observé en fonction de la taille de la molécule. La largeur à mi-hauteur du pic de corrélation est proportionnelle à la vitesse de relaxation transversale R_2 elle-même proportionnelle au temps de corrélation τ_c de la molécule.

De nombreuses avancées ont été faites, aussi bien concernant la préparation des échantillons que des progrès au niveau des spectromètres et des méthodes d'analyse pour repousser les limites de la technique.

II.1.2 Les progrès instrumentaux

Nous avons vu que la sensibilité d'une expérience augmente avec le champ magnétique en $B_0^{3/2}$. La puissance des aimants n'a cessé d'augmenter et est passée de 2,1 Tesla en 1962 (correspondant à une fréquence ^1H de 90 MHz) à 22,1 Tesla en 2005 (soit 950 MHz, Oxford Instrument produit non commercial). Un spectre enregistré à 800 MHz est 2 fois plus résolu et 6,4 fois plus sensible qu'un spectre enregistré à 400 MHz. L'augmentation de l'intensité du champ permet de diminuer le nombre de recouvrements et d'augmenter l'intensité des raies de résonances.

Une autre avancée importante au niveau des spectromètres est l'arrivée des cryosondes. Dans ces dernières, les bobines sont plongées dans un bain d'hélium liquide qui permet de diminuer le bruit thermique et d'augmenter la sensibilité des expériences d'un facteur 2 ou 3. L'utilisation de cryosondes peut donc permettre de diminuer les concentrations de l'échantillon (qui peut être difficile à obtenir) à condition que celui-ci soit stable à de faibles concentrations salines. En effet, l'efficacité de ces sondes diminue fortement avec l'augmentation de la force ionique mais cet aspect est en cours d'amélioration avec l'élaboration en 2005 d'une cryosonde permettant l'étude d'échantillons ayant une concentration saline jusqu'à 500 mM NaCl (<http://www.varianinc.com/>)

II.1.3 Le marquage isotopique et la RMN hétéronucléaire

Des avancées importantes en RMN proviennent des progrès concomitants réalisés dans le marquage isotopique et le développement de la RMN hétéronucléaire multidimensionnelle.

Les macromolécules biologiques sont des molécules organiques constituées d'hydrogène, d'azote, de carbone, d'oxygène, de soufre et de phosphore. Parmi ces éléments, seuls le proton et le phosphore sont les éléments dont les isotopes les plus abondants possèdent un spin $\frac{1}{2}$. Des techniques de marquages isotopiques permettent aujourd'hui d'introduire de manière **partielle uniforme, totale** ou **localisée** des isotopes avec un spin nucléaire. L'introduction d'hétéronoyaux possédant un spin $\frac{1}{2}$ est très intéressante puisqu'elle permet d'augmenter la résolution des spectres. En effet, depuis la fin des années 1980 / début des années 1990, des expériences hétéronucléaires multidimensionnelles ont été développées. Elles exploitent les couplages scalaires 1J (à travers 1 liaison chimique) entre hétéronoyaux et apportent deux avantages :

- La corrélation de paires de noyaux reliées par une liaison covalente qui facilite l'attribution et l'identification de la nature chimique des noyaux.
- L'augmentation de la résolution des spectres. En effet, les résonances protons vont être séparées dans un espace à deux, trois voire quatre dimensions en fonction de la nature chimique de leurs voisins.

Ces évolutions ont permis d'augmenter la gamme de taille des molécules étudiables. La détermination par RMN de la structure haute résolution peut être faite pour des protéines de l'ordre de 30 kDa à 40 kDa. La détermination du repliement global peut se faire pour des molécules plus grosses jusqu'à 80 kDa environ.

Il existe deux types de marquages isotopiques, le marquage **uniforme** et le marquage **spécifique**. Selon les besoins de l'étude, l'un ou l'autre ou les deux types de marquage peuvent être effectués. Le marquage spécifique peut faciliter l'étude lorsque l'on cherche à identifier des résidus précis ou si l'on veut observer des interactions intermoléculaires. Néanmoins son coût est élevé puisqu'il est nécessaire de se procurer des acides aminés marqués ou leurs précurseurs.

II.1.4 La deutération

Un marquage très utilisé pour l'étude des molécules de grande taille est la **deutération**. Ce marquage permet de remplacer tout ou une partie des protons (1H) présents dans la molécule par des deutérium (2H ou D). Le deutérium possède un spin nucléaire ($S=1$) mais son rapport gyromagnétique étant différent de celui des autres isotopes utilisés (1H , ^{15}N , ^{13}C , ^{31}P), sa gamme spectrale sera différente et il ne sera pas « excité » lors des expériences et sera donc invisible. Il faudra par contre découpler les couples X-D (16) afin de supprimer le couplage scalaire entre ces noyaux qui diminue la sensibilité du noyau X.

La deutération peut être partielle (et uniforme) ou totale. Elle permet, d'une part la **simplification des spectres** du fait de la diminution du nombre de protons et d'autre part **d'augmenter le rapport**

signal/bruit des expériences. Cette augmentation de sensibilité est due à deux phénomènes : la **diminution de la vitesse de relaxation** des spins ^{13}C aliphatiques et la **diminution de la diffusion de spin** des ^1H dans les expériences de type NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy).

La diminution de la relaxation des ^{13}C aliphatiques s'explique par la différence des rapports gyromagnétiques du ^1H et du D ($\gamma_{\text{H}} \approx 6,5\gamma_{\text{D}}$). La relaxation transversale (T_2) des $\text{C}\alpha$ est extrêmement sensible à la deutération et diminue d'un facteur 9 lorsque le $\text{H}\alpha$ est remplacé par un deutérium (Figure II.3a). Par contre, la relaxation des CO et des N n'est pas modifiée, ces derniers n'étant pas liés covalamment à des deutérons (Figure II.3b).

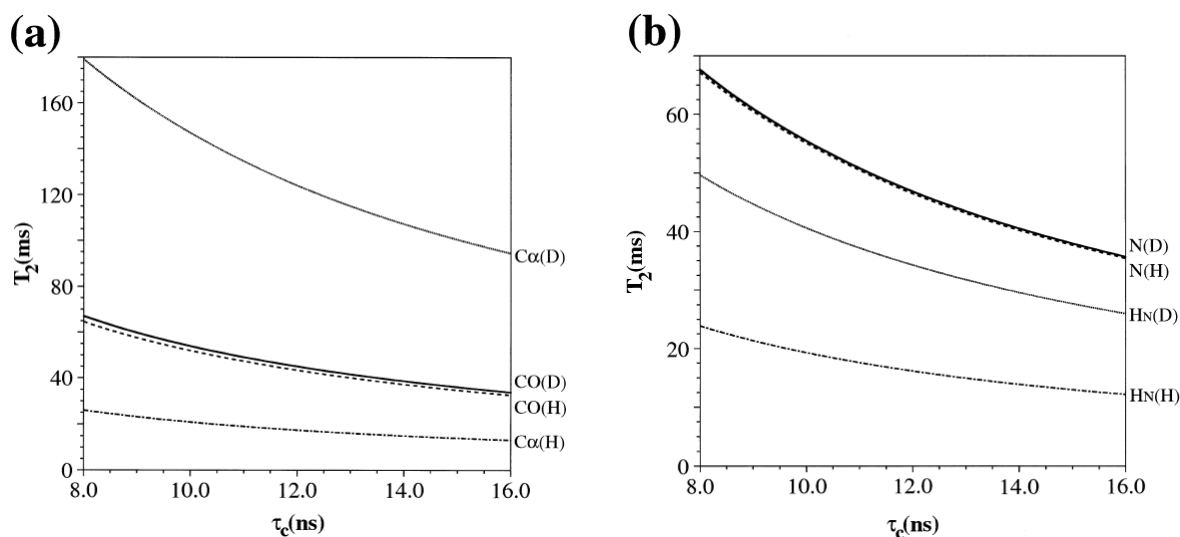


Figure II.3 : Comparaison des T_2 des différents noyaux en fonction du τ_c de la molécule et de la deutération (issue de (52))

Un autre avantage provenant de la deutération est la diminution de la densité de proton. Ceci permet de limiter le phénomène de diffusion de spin qui correspond à la fuite de magnétisation du fait des multiples interactions homonucléaires $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ (Figure II.4). Dans ce cas, les mesures de distances entre noyaux par l'utilisation de l'effet NOE (Nuclear Overhauser effect) seront plus précises et des NOEs pour des protons distants jusqu'à 8 Å peuvent être détectés (24).

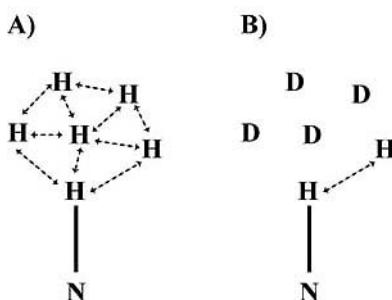


Figure II.4 : Diminution de la densité de proton due à la deutération et expliquant la diminution de la diffusion de spin. Les flèches en pointillés correspondent aux interactions $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ à l'origine de la diffusion de spin. (reproduit d'après (4))

Pour les molécules de taille moyenne (20-25 kDa), un taux de deutération compris entre 50 et 75% permet de compenser la diminution de sensibilité du fait de l'augmentation de la taille de la molécule (13).

Bien que la deutération ait amené des améliorations évidentes, elle entraîne une diminution du nombre de protons et donc une diminution du nombre de contraintes spatiales issues de l'analyse des NOEs, beaucoup d'interactions n'étant plus mesurables. Une deutération totale n'est pas conseillée pour les molécules aux alentours de 20 kDa et Laue et *al.* (30) ont proposé qu'un taux de deutération de 50% est un bon compromis pour attribuer les chaînes latérales et enregistrer des expériences NOESY.

Dans le cas des protéines de taille > 25 kDa, il devient nécessaire d'avoir des taux de deutération importants afin d'obtenir des spectres bien résolus, mais dans ce cas, les contraintes de type NOE ne seront plus accessibles empêchant la détermination d'une structure haute résolution. Pour palier à ce problème, d'autres contraintes peuvent être utilisées, basées sur l'analyse des NOEs entre méthyles. Du fait de leur hydrophobicité, les résidus hydrophobes comme les valines, les leucines et les isoleucines sont souvent impliqués dans le cœur hydrophobe des protéines. On peut donc spécifiquement protoner ces résidus au niveau des méthyles par marquage spécifique (15) et observer les interactions entre les méthyles proches dans l'espace afin de déterminer le repliement de la protéine (14).

Depuis les années 1990, une autre approche permettant de collecter des contraintes spatiales dans les molécules deutérées a été développée. Elle se base sur la mesure des couplages dipolaires résiduels (RDC). Ces derniers contiennent l'information permettant d'orienter les différents vecteurs de la molécule (exemple : les N-H, C-H...), les uns par rapport aux autres. Pour les mesurer, l'échantillon est placé dans un milieu cristal liquide qui va induire de l'ordre dans l'échantillon. Dans ces conditions, la réorientation moléculaire n'est plus isotrope et le couplage dipolaire n'est plus moyenné à 0 permettant ainsi de le mesurer. Ce paramètre permettra d'obtenir des contraintes orientationnelles comme nous le verrons plus tard. Ces contraintes sont une source très intéressante de contrainte puisqu'elles ne sont pas dépendantes de la distance contrairement au NOEs.

II.2 Stratégie générale de résolution d'une structure de protéine par RMN

La résolution d'une structure de protéine par RMN peut être décomposée en 4 grandes étapes (Figure II.5) :

- L'obtention de l'échantillon
- L'attribution de toutes les résonances de la protéine (chaîne principale, chaînes latérales)
- Le recueil de contraintes structurales (NOEs, RDCs)
- Le calcul de structure

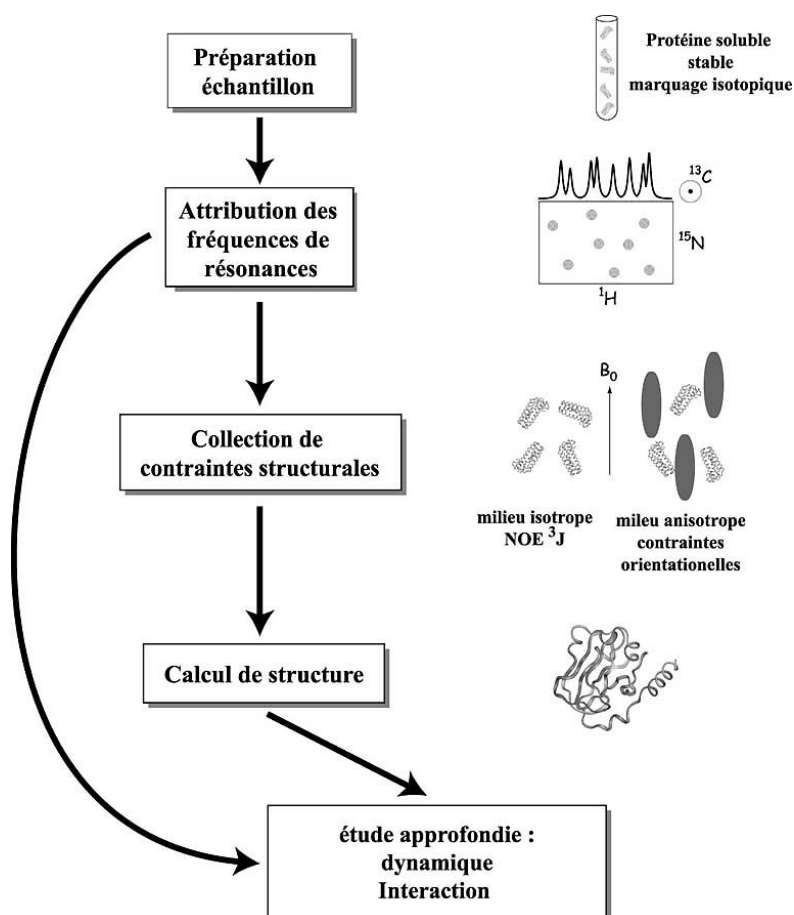


Figure II.5 : Les différentes étapes d'une étude RMN (issue de(42))

Les conditions de préparation de l'échantillon vont dépendre de la taille de la molécule qui va elle-même déterminer le type de marquage isotopique à réaliser.

II.2.1 Préparation de l'échantillon biologique

Le type de marquage isotopique dépend essentiellement de la taille de la protéine à étudier. En dessous de 10 kDa (~ 90 résidus), la RMN du proton suffit pour l'étude de la biomolécule. Entre 10 et 15 kDa (90 et 130 résidus), un simple marquage ^{15}N permet d'augmenter la résolution spectrale et pour les protéines de poids supérieur, un double marquage ^{15}N , ^{13}C devient nécessaire. Pour les protéines de plus de 20 kDa, un triple marquage ^{15}N , ^{13}C et ^2H est recommandé afin de limiter la relaxation des $\text{C}\alpha$.

De manière générale, les prix des isotopes ayant diminué (par exemple en une dizaine d'années, le $^{13}\text{C}_6$ -glucose est passé de 300 € à 60 € le gramme), un double marquage est généralement réalisé car il permet de faciliter et d'accélérer l'attribution des résonances et le recueil de contraintes structurales

II.2.1.1 Le marquage isotopique

Le marquage isotopique est réalisé en surexprimant la protéine dans des micro-organismes (bactéries ou des levures) cultivés dans des milieux enrichis avec les isotopes d'intérêt. Le milieu peut être minimum et contenir du $^{13}\text{C}_6$ -glucose et du ^{15}N -chlorure d'ammonium pour seules sources de ^{13}C et ^{15}N ou riche et être issu de lysats bactériens réalisés à partir de bactéries ayant poussées en milieu marqué (exemple des milieux commerciaux de l'entreprise Silantes).

Pour les protéines issues d'organismes eucaryotes, le marquage ^{13}C peut être réalisé à partir de levures *Pischia pastoris* dans un milieu minimum contenant du ^{13}C -méthanol pour seule source de carbone (29).

Si un marquage uniforme au deutérium est nécessaire, il suffit que du D_2O soit présent dans le milieu. Le rapport $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ utilisé sera important dans le taux de marquage obtenu. Néanmoins, l'eau lourde affecte le métabolisme des cellules (21) (modification de la longueur des liaisons hydrogènes, vitesses de réactions...) ce qui entraîne un ralentissement notable de la croissance cellulaire. En effet, alors que le temps de génération (temps nécessaire pour multiplier par deux le nombre de cellules) de bactéries *E.coli* est de 40 minutes environ en milieu minimum protoné, il passe à 1 heure en milieu deutéré.

En ce qui concerne le marquage spécifique, il peut être réalisé sur les azotes de la chaîne principale (37) et sur les carbones et deutérons des chaînes latérales, la plupart des acides-aminés marqués étant disponible commercialement. Le marquage spécifique reste néanmoins une alternative coûteuse.

II.2.1.2 Purification de la protéine et préparation de l'échantillon

La purification d'une protéine consiste à l'isoler de toutes les autres molécules présentes dans une cellule. Il s'agit d'une étape critique et essentielle qui peut demander beaucoup de temps. La RMN n'étant pas très sensible, beaucoup de matériel doit être disponible (du même ordre que la cristallographie). En effet, l'échantillon doit avoir une concentration minimale de $\sim 0,5$ mM dans 450 μL ou 300 μL si des tubes spéciaux sont disponibles. La préparation de l'échantillon est très importante et doit être réalisée avec beaucoup de précaution car l'échantillon doit rester stable et homogène pendant plusieurs semaines à température ambiante. On peut donc préparer son échantillon sous atmosphère inerte (Ar , N_2) pour limiter l'oxydation des cystéines et des méthionines dans le temps et également ajouter des inhibiteurs de protéases et des bactéricides.

Lorsque tout ce travail a été réalisé, l'étude RMN proprement dite peut commencer. La première étape sera **l'attribution des fréquences résonances**.

II.2.2 Stratégie d'attribution des fréquences de résonances

II.2.2.3 Attribution des fréquences de résonances de la chaîne principale pour une protéine doublement marquée ^{15}N , ^{13}C

Dans le cas d'une protéine marquée ^{15}N et ^{13}C , l'attribution des résonances de la chaîne principale repose sur l'enregistrement d'expériences tridimensionnelles. Ces expériences permettent de corréler l'azote et le proton amide d'un résidu (i) avec un troisième atome (^1H ou ^{13}C) du même résidu (i) ou du résidu précédent (i-1).

Cette corrélation est possible grâce aux couplages scalaires hétéronucléaires à travers une ou deux liaisons chimiques (^1J ou ^2J) (Figure II.6). Selon les expériences, le couple (NH) d'un résidu (i) est corrélé au carbonyle (CO), au carbone α (CA) ou au carbone β (CB) ou au proton α (HA) des résidus (i) et (i-1).

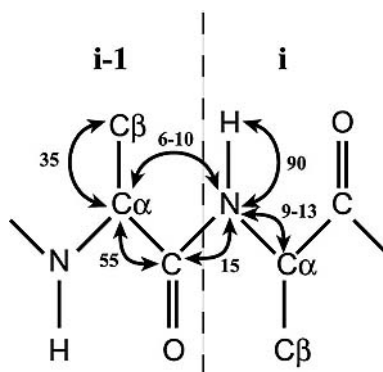


Figure II.6 : Valeurs en Hertz des constantes de couplages ^1J et ^2J utilisées pour les transferts d'aimantation dans les protéines marquées ^{15}N et ^{13}C .

Classiquement, 6 expériences 3D sont utilisées au laboratoire. Elles permettent de corréler les groupements amides aux C α , C β et CO d'un même résidu et du résidu précédent. Il s'agit des expériences HNCO, HN(CA)CO, MQ_HNCOCA, MQ_COHNCA, HN(CA)CB et HN(COCA)CB. Les expériences classiques HN(CO)CA et HNCA permettant d'identifier le C α_{i-1} et C α_i ont été remplacées au laboratoire par des expériences à dimensionnalité réduite (MQ_HNCOCA, MQ_COHNCA) (5, 44). Dans ces expériences, 4 noyaux sont édités en fréquences dans un espace à trois dimensions. Les fréquences ^{13}C sont éditées dans la même dimension indirecte et les fréquences C α et CO sont obtenues en mesurant la séparation (C α) et le centre (CO) des 2 pics de corrélation (Figure II.7). L'expérience 3D MQ-HNCOCA permet de relier les noyaux H $_N$, N $_i$, CO $_{i-1}$ et C α_{i-1} et l'expérience 3D MQ_COHNCA permet de relier les noyaux H $_N$, N $_i$, CO $_{i-1}$, C α_{i-1} et C α_i . Les noyaux C α_{i-1} et C α_i sont observables simultanément dans la MQ_COHNCA du fait du transfert d'aimantation simultané sur le C α_{i-1} par un couplage scalaire ^2J et sur le C α_i par un couplage ^1J (Figure II.6), les deux constantes de couplages étant très proches.

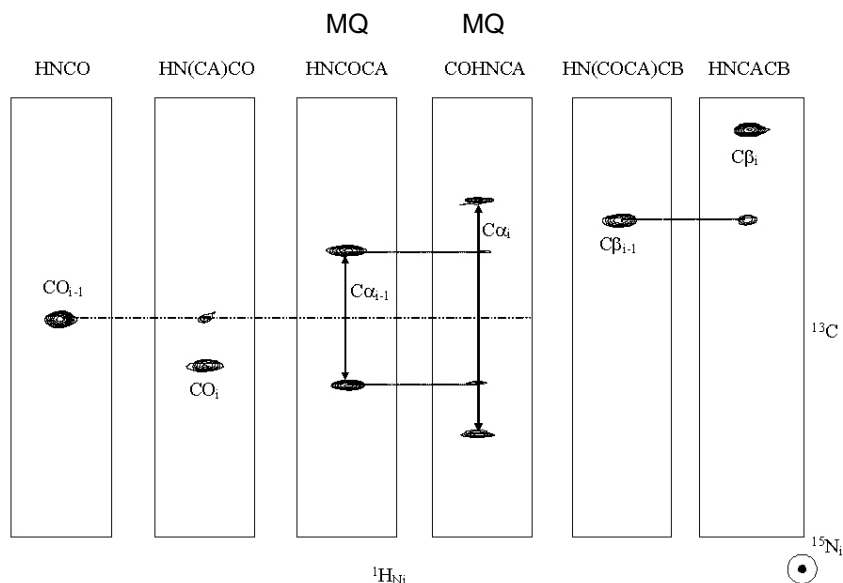


Figure II.7 : Exemple de zones spectrales d'expériences 3D triple résonance extraites pour une valeur de fréquence ^1H ^{15}N correspondant à un pic de corrélation sur l'HSQC. On met en évidence la méthode d'attribution et le mode d'interprétation des spectres.

Les informations obtenues ainsi que le temps d'enregistrement de ces expériences sont résumés dans le Tableau II.1 et la Figure II.8.

Expériences	Résonances obtenues	Sensibilité	Temps d'acquisition
HSQC ^1H-^{15}N	$\text{H}_{\text{Ni}}, \text{N}_i$	++++	40'
3D HNCO	$\text{H}_{\text{Ni}}, \text{N}_i, \text{CO}_{i-1}$	+++	1 ½ jours
3D HN(CA)CO	$\text{H}_{\text{Ni}}, \text{N}_i, \text{CO}_i (\text{CO}_{i-1})$	---	3 jours
3D MQ_HNCOCA	$\text{H}_{\text{Ni}}, \text{N}_i, \text{CO}_{i-1} \text{ C}_{\alpha i}$	++	3 jours
3D MQ_COHNCA	$\text{H}_{\text{Ni}}, \text{N}_i, \text{CO}_{i-1}, \text{C}_{\alpha i} (\text{C}_{\alpha i-1})$	+	3 jours
3D HN(CA)CB	$\text{H}_{\text{Ni}}, \text{N}_i, \text{CO}_{i-1}, \text{C}_{\beta i} (\text{C}_{\beta i-1})$	--	3 jours
3D HN(COCA)CB	$\text{H}_{\text{Ni}}, \text{N}_i, \text{CO}_{i-1}, \text{C}_{\beta i-1}$	-	3 jours

Tableau II.1 : Expériences enregistrées pour l'attribution classique de la chaîne principale.

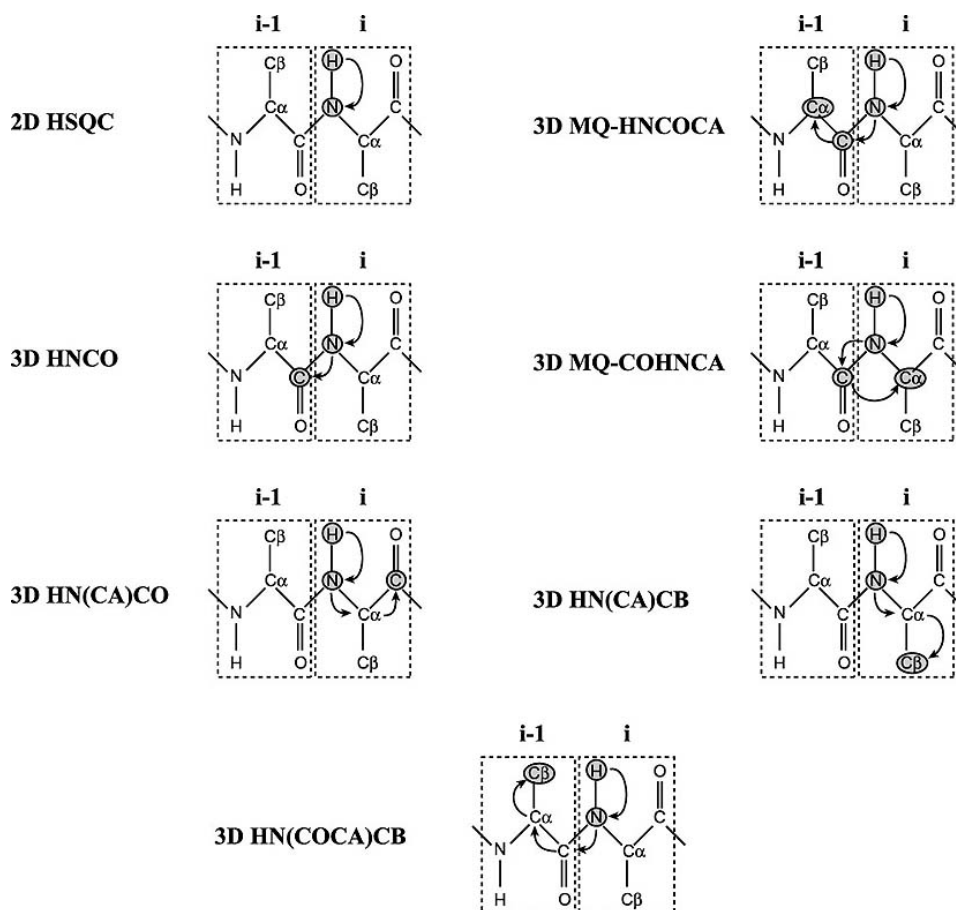


Figure II.8 : Chemin de transfert d'aimantation suivi lors des expériences d'attribution 3D utilisées pour une protéine deutérée. Les fréquences obtenues pour chaque expérience correspondent aux noyaux entourés en gris. Chaque cadre délimite un résidu.

A partir de ces expériences, on obtient un jeu redondant de fréquences de résonances permettant de déduire l'enchaînement des noyaux le long de la chaîne polypeptidique (Figure II.9).

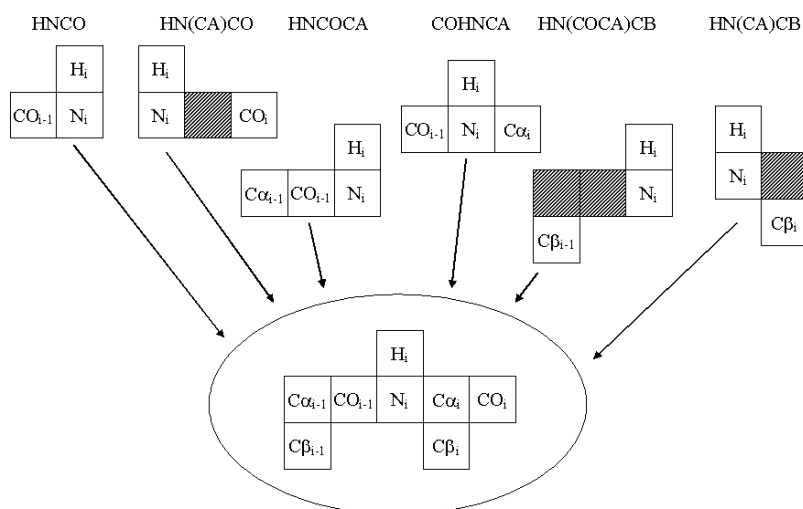


Figure II.9 : Schéma représentant les fréquences de résonances attribuées pour chaque expérience. On notera la redondance de certaines fréquences permettant de déduire l'enchaînement des noyaux le long de la chaîne polypeptidique. Les cases grises correspondent à des noyaux qui ne sont pas observables.

L'attribution séquentielle est généralement effectuée d'une manière automatique ou semi automatique par l'utilisation de programme tels que AUTOASSIGN (56), Smartnotebook (43) ou encore ALPS (28) développé au laboratoire. Pour un couple (H_{Ni} , N_i), le programme va rechercher un couple (H_{Nj} , N_j) tel que $CO_j = CO_{i-1}$, $C_{\alpha j} = C_{\alpha i-1}$, $C_{\beta j} = C_{\beta i-1}$ ce qui implique que le résidu (j) précède le résidu (i). Le type de résidu est identifié grâce aux déplacements chimiques des C_{α} et C_{β} obtenus et comparés avec les déplacements chimiques C_{α} et C_{β} moyens mesurés pour toutes les protéines dont l'attribution des résonances a été déposée dans la BMRB (<http://www.bmrb.wisc.edu>).

Lorsque les résonances de la chaîne principale ont été attribuées, il est possible d'obtenir les premières informations structurales sur la molécule. En effet, les déplacements chimiques des carbonyles et des carbones α sont sensibles aux conformations locales et permettent de déterminer et de localiser les structures secondaires dans la protéine (55). Nous reviendrons sur l'utilisation de ces déplacements chimiques dans le chapitre suivant.

II.2.2.4 Attribution des chaînes latérales

L'attribution des résonances des chaînes latérales se fait à partir des expériences $H(CCO)NH$ -TOCSY, $(H)C(CO)NH$ -TOCSY, $(H)CCH$ -TOCSY et $H(C)CH$ -TOCSY (Figure II.10). La $(H)C(CO)NH$ -TOCSY et la $H(CCO)NH$ -TOCSY permettent d'identifier les systèmes de spins carbones et protons du résidu (i-1) en les reliant au proton et à l'azote de la liaison amide du résidu (i). L'attribution spécifique des carbones se fait à l'aide de leurs déplacements chimiques caractéristiques pour chaque type d'acide aminé (disponibles dans la banque de données BMRB).

L'attribution des couples protons/carbones se fait grâce à la $(H)CCH$ -TOCSY et à la $H(C)CH$ -TOCSY.

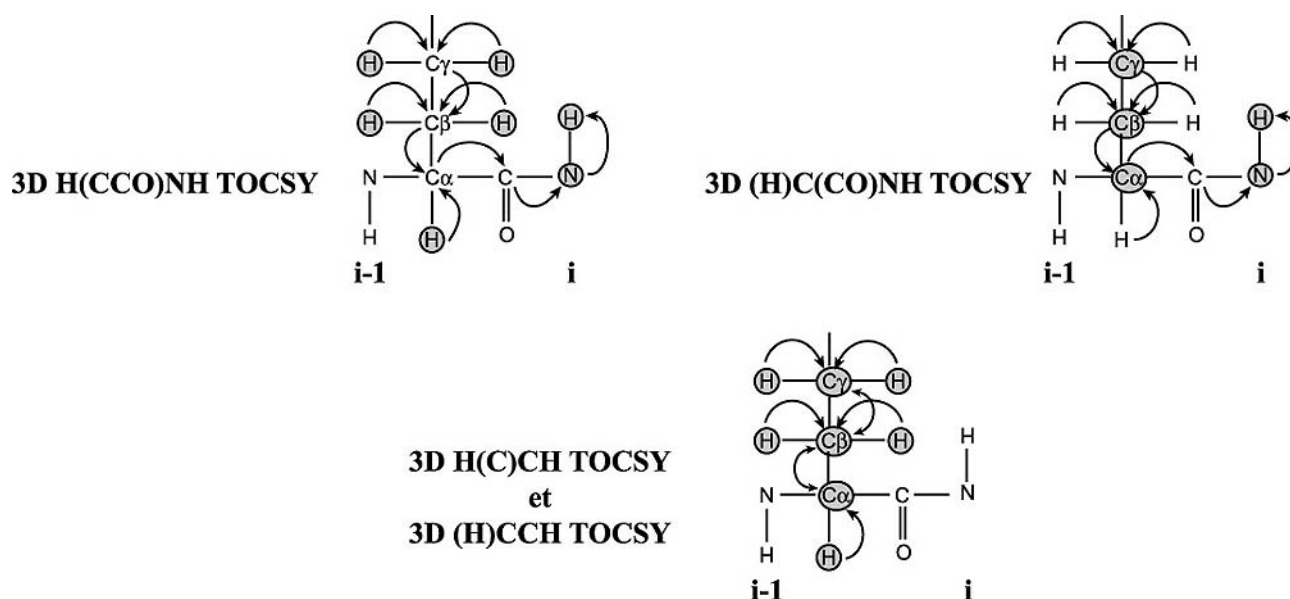


Figure II.10 : Principe des expériences permettant l'attribution des chaînes latérales.

A l'issue de l'attribution des résonances de la chaîne principale et des chaînes latérales, seules des informations sur les structures secondaires sont disponibles.

Une attribution complète des chaînes latérales est un pré-requis essentiel pour l'obtention de contraintes spatiales non ambiguës.

Afin d'obtenir ces contraintes spatiales, des expériences permettant d'accéder à des informations de distance dans l'espace et/ou d'orientation relative dans l'espace doivent être enregistrées.

II.2.3 Collection des contraintes structurales

Le calcul d'une structure résolue par RMN repose sur l'utilisation de contraintes géométriques qui sont issues de plusieurs paramètres observables par RMN : la relaxation dipolaire (NOE, Nuclear Overhauser Effect), le couplage scalaire (**J**) et le déplacement chimique (δ). Depuis les années 1990, un nouveau paramètre permet d'obtenir des contraintes structurales utilisables pour le calcul de structure : le couplage dipolaire résiduel (**RDC**). De même, la détermination des liaisons hydrogène par des expériences RMN permet d'obtenir des informations sur les hélices α et sur l'appariement des brins β .

II.2.3.5 Les NOEs

Le NOE peut être défini comme le changement d'intensité d'une résonance d'un spin (S) quand les transitions d'un autre spin (I) sont perturbées par rapport à l'équilibre. Ce phénomène est le résultat du transfert d'aimantation du spin I vers le spin S proches dans l'espace lorsque le spin I est soumis à un champ radiofréquence. L'amplitude du NOE peut être considérée comme le changement d'intensité entre l'intensité à l'équilibre S_{eq} et l'intensité en présence de la perturbation S_{sat} du spin S :

$$NOE_{IS} = \frac{S_{sat} - S_{eq}}{S_{eq}}$$

On parle également de facteur d'amplification pour définir le NOE.

Le NOE, caractérisé par sa vitesse de relaxation croisée σ_{IS} , est sensible à la **distance** séparant les spins I et S et également au **mouvement local** τ_c du vecteur les reliant (Équation 1).

$$\sigma_{IS}^{NOE} = \frac{\hbar^2 \mu_0^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2 \tau_c}{40 \pi^2 r_{IS}^6} \left(-1 + \frac{6}{1 + 4 \omega_0^2 \tau_c^2} \right)$$

Équation 1 : relation entre la vitesse de transfert d'aimantation croisée et la distance entre les spins I et S

où γ_I et γ_S sont les rapports gyromagnétiques des spins I et S (en rad.s^{-1}), r_{IS} est la distance entre les deux spins (en m), μ_0 est la constante de perméabilité magnétique du vide, ω_0 la fréquence de Larmor et \hbar est la constante de Planck divisée par 2π ($1.05457 \cdot 10^{-34}$ J.s).

Afin de pouvoir déterminer la distance entre deux spins, on néglige généralement les mouvements locaux en faisant l'approximation que la molécule est un corps rigide dont le mouvement est uniquement déterminé par le temps de corrélation global τ_c . Dans ce cas, la vitesse de transfert d'aimantation σ_{IS}^{NOE} ne dépend plus que de la distance r_{IS} .

La vitesse de transfert σ_{IS}^{NOE} est déterminée à partir de l'intensité ou du volume des pics de corrélations observés dans des expériences de type NOESY. Lorsque deux spins sont en interaction dipolaire, un pic de corrélation sera visible sur le spectre NOESY. Des NOEs peuvent être mesurés entre protons distants de moins de 6 Å dans une protéine protonée et de moins de 8 Å dans une protéine perdeutérée (24).

Des NOEs caractéristiques sont observables dans les structures secondaires. Ils sont résumés dans le Tableau II.2 et la Figure II.11.

Distance	β_{ap}, β_p	Hélice α	Hélice 3_{10}	Coude βI	Coude βII
$d_{\alpha N}(i, i+4)$					
$d_{\alpha\beta}(i, i+3)$					
$d_{\alpha N}(i, i+3)$					
$d_{NN}(i, i+2)$					
$d_{\alpha N}(i, i+2)$					
d_{NN}					
$d_{\alpha N}$					

Tableau II.2 : Tableau résumant les interactions NOEs caractéristiques observables dans les structures secondaires. L'épaisseur des traits reflète l'intensité des pics.

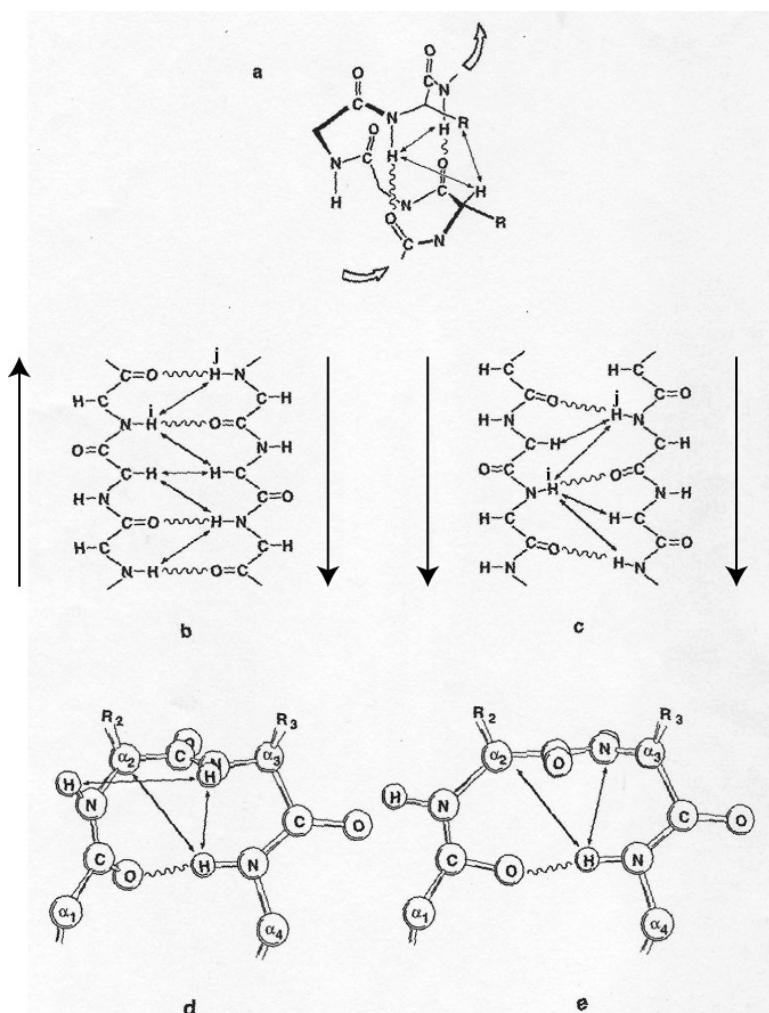


Figure II.11 : NOEs 1H observables (doubles flèches) dans les différentes structures secondaires. a) hélice α ; b) feuillet β antiparallèle ; c) feuillet β parallèle ; d) coude β type I ; e) coude β type II (issue de(6)).

Les NOEs entre résidus éloignés dans la séquence primaire (NOE « long range ») sont une source d'information très importante car ils permettent de contraindre le repliement lors du calcul de structure. Si la protéine nécessite une deutération importante, l'utilisation des NOEs méthyles-méthyles peut alors fournir

des informations très utiles pour le calcul du repliement global d'une protéine comme cela a été montré pour la première fois sur un complexe SH2/polypeptide (14).

Lorsque l'attribution des chaînes latérales est incomplète, l'identification non ambiguës des NOEs devient impossible ce qui rend le calcul de structure plus difficile voir impossible. De même, lorsque l'échantillon est trop deutéré, beaucoup de NOEs ne seront plus observables ce qui limitera le nombre de contraintes spatiales pour le calcul de structure. Dans ce cas, d'autres contraintes spatiales peuvent être obtenues avec la mesure des couplages dipolaires résiduels.

II.2.3.6 Les couplages dipolaires résiduels

Rappels théoriques

L'amplitude du couplage dipolaire résiduel entre deux spins I et S est donnée par la relation suivante :

$$d_{IS} = d_{IS}^{\max} \frac{1}{2} (3\cos^2\theta - 1)$$

Équation 2 : expression du couplage dipolaire résiduel

La barre signale que la valeur du couplage dipolaire mesurée dépend de l'orientation du vecteur pondérée par sa probabilité d'être dans l'orientation θ ($\theta \in [0, 2\pi]$) où θ est l'angle du vecteur reliant les spins I et S avec le champ magnétique statique (Figure II.12).

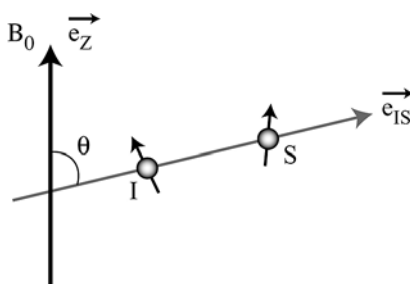


Figure II.12 : Angle θ utilisé dans le calcul du couplage dipolaire $\cos \theta = \vec{e}_{IS} \cdot \vec{e}_z$

Dans un milieu isotrope, toutes les orientations étant possibles et « équiprobables », le couplage dipolaire résiduel est moyenné à 0. Dans un milieu anisotrope, l'orientation moléculaire préférentielle entraîne la persistance des termes de couplage dipolaire. Cette approche repose sur la détermination du tenseur d'alignement de la molécule dans le milieu cristallin liquide.

Pour cela, Bax et *al.* (2) ont montré que l'Hamiltonien du couplage dipolaire résiduel pouvait être réécrit dans le repère de coordonnées moléculaire arbitraire par rapport au champ magnétique B_0 . Dans ce cas, il peut être exprimé dans un système de coordonnées polaires de la manière suivante :

$$D_{IS} = -Sd_{IS}^{\max} \left(A_a (3\cos^2\theta - 1) + \frac{3}{2} A_r \sin^2\theta \cos 2\phi \right)$$

avec

$$A_a = \frac{1}{2} A_{zz}$$

$$A_r = \frac{1}{3} (A_{xx} - A_{yy})$$

et visualisé comme dans la Figure II.13.

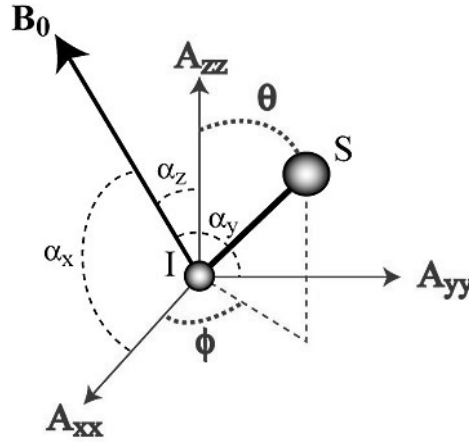


Figure II.13 : Vecteur internucléaire IS représenté dans son tenseur d'alignement A. Les angles α_x , α_y , α_z sont les angles d'Euler caractérisant la rotation du repère du tenseur d'alignement par rapport au champ magnétique statique B_0 .

Ce changement de repère permet de passer du repère du champ magnétique statique B_0 au repère moléculaire arbitraire du tenseur d'alignement. Le paramètre S est un paramètre d'ordre qui tient compte de la flexibilité du vecteur internucléaire. A_{xx} , A_{yy} , A_{zz} reflètent la probabilité des axes x, y et z d'être parallèles à B_0 . θ et ϕ correspondent aux angles définissant la position du vecteur IS dans le repère moléculaire arbitraire du tenseur d'alignement. Cette expression montre que la valeur du couplage dipolaire va dépendre de l'orientation du vecteur IS dans le référentiel du tenseur d'alignement A. De ce fait, la valeur du couplage dipolaire permettra donc d'obtenir des informations concernant l'orientation des différents vecteurs de la protéine par rapport au référentiel du tenseur d'alignement et donc des informations sur l'orientation relative des vecteurs les uns par rapport aux autres.

La détermination du tenseur d'alignement correspond en fait à la détermination des 5 paramètres indépendants de la matrice de Saupe. Ces paramètres sont les composantes A_a et A_r du tenseur d'alignement et les 3 angles d'Euler (α_x , α_y , α_z) qui caractérisent la rotation du repère du tenseur d'alignement par rapport au champ magnétique statique B_0 .

Le couplage dipolaire résiduel est dégénéré (Figure II.14). Afin de trouver l'orientation exacte du vecteur reliant deux spins I et S, il est nécessaire d'utiliser un second milieu cristal liquide induisant un alignement différent de la molécule. On obtient alors 2 jeux de données avec des tenseurs d'alignement différents qui vont permettre de lever la dégénérescence. L'orientation réelle du vecteur internucléaire correspondra à l'intersection des isocontours obtenus pour chaque tenseur d'alignement.

Dans le cas général où le tenseur d'alignement n'est pas axialement symétrique, il existe au maximum 8 intersections. L'utilisation d'un 3^{ème} milieu permettra de diminuer la dégénérescence par 2. Dans ce cas, la véritable orientation du vecteur ne pourra pas être déterminée à partir de la mesure d'un seul type de couplage dipolaire. Il sera nécessaire de mesurer d'autres couplages dans un motif chiral dont la structure est connue (par exemple un plan peptidique). Dans ce cas, la mesure des couplages dipolaires résiduels dans deux milieux sera suffisante pour déterminer le tenseur d'alignement.

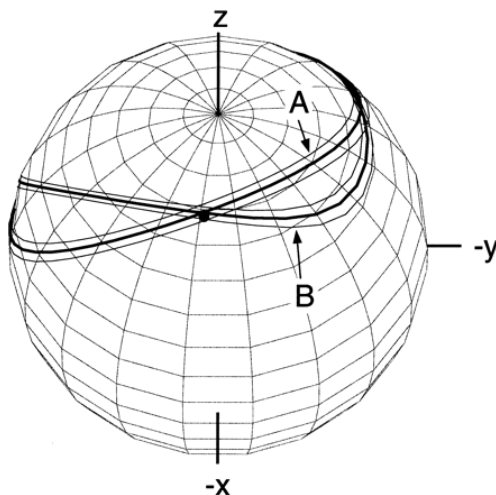


Figure II.14 : Le couplage dipolaire résiduel est dégénéré. Une valeur peut correspondre à plusieurs orientations possibles comme le montre le tracé A par exemple. La dégénérescence est levée avec l'utilisation d'un second milieu cristal liquide n'ayant pas les mêmes propriétés que le premier. On obtient alors deux jeux de données avec des tenseurs d'alignement différents qui vont permettre de trouver l'orientation du vecteur observé (issu de (1)).

Afin d'obtenir ces informations, il est nécessaire d'introduire de l'ordre dans la solution. Plusieurs milieux existent avec des propriétés différentes.

Les milieux orientants

Voici quelques exemples de milieux permettant d'obtenir un faible alignement des macromolécules. De manière générale on peut distinguer deux types de milieux :

- Les milieux qui vont induire un alignement par gêne stérique.
- Les milieux qui vont induire un alignement par interaction électrostatique.

Les bicelles lipidiques

Les bicelles lipidiques ont été le premier milieu cristal liquide utilisé pour orienter faiblement des macromolécules biologiques (3, 45). La composition du mélange le plus utilisé est à base de dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) et de dihexanoylphosphatidylcholine (DHPC). Au dessus d'une température critique qui dépend du rapport molaire DMPC/DHPC, la solution passe d'une phase gel parfaitement limpide à une phase nématique translucide mais un peu moins limpide (31, 39). Bax et *al.* ont montré que cette phase correspond à la formation de bicouches lamellaires perforées (12) (Figure II.15). Les conditions de préparation des bicelles sont expliquées dans la publication de Ottiger et *al.* (31). Ce milieu est globalement neutre et induit un alignement par gêne stérique. Des améliorations ont été effectuées pour l'optimiser telle que l'incorporation de petits détergents chargés comme le CTAB (bromure de cetyltrimethyl ammonium) ou le SDS (sodium dodecyl sulfate) (26) qui permettent d'augmenter la stabilité des bicelles, ou encore l'utilisation de phospholipides éther (32) qui permet également d'augmenter la stabilité des bicelles car les lipides DMPC et DHPC possèdent des liaisons ester et ont tendance à s'hydrolyser.

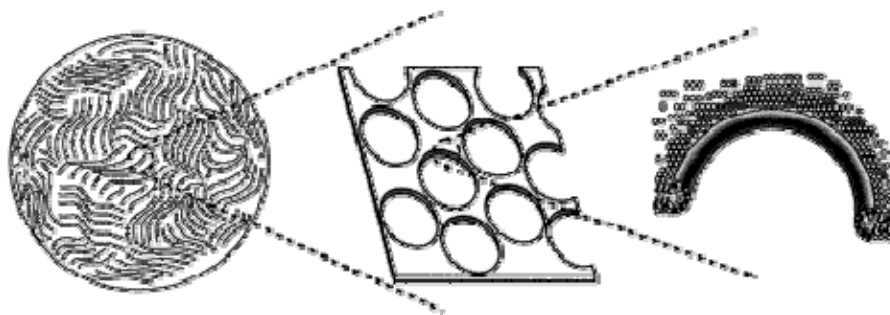


Figure II.15 : Représentation schématique de la morphologie de bicelles dans une phase cristal liquide lamellaire (issue de (12)).

Ce milieu présente l'avantage de pouvoir mesurer sur le même échantillon le couplage scalaire et le couplage dipolaire juste en augmentant la température afin de passer la température de transition. Néanmoins, en l'absence de l'utilisation de phospholipides éthers qui ont un coût élevé, les bicelles se dégradent rapidement à cause de l'hydrolyse des chaînes d'acides gras (31). D'autre part, la stabilité des bicelles dépend de la force ionique et diminue avec son augmentation.

Les bactériophages filamenteux

Les phages filamenteux ont été introduits au même moment par Clore et *al.* et Hansen et *al.* en 1998 (9, 17, 18). Ils forment des cylindres de 2 μm de longueur et de 66 Å de diamètre et sont constitués d'un simple brin d'ADN de 7,4 kb entouré d'une gaine de 7 620 sous-unités de protéines hélicales identiques de 46 acides aminés chacune. Ces hélices interagissent fortement avec l'ADN et font un angle de 15° avec l'axe du phage. La répétition régulière de ce motif entraîne une forte susceptibilité magnétique à l'origine de

l'alignement des phages dans un champ magnétique élevé. Cet alignement se fait parallèlement au champ magnétique B_0 (Figure II.16).

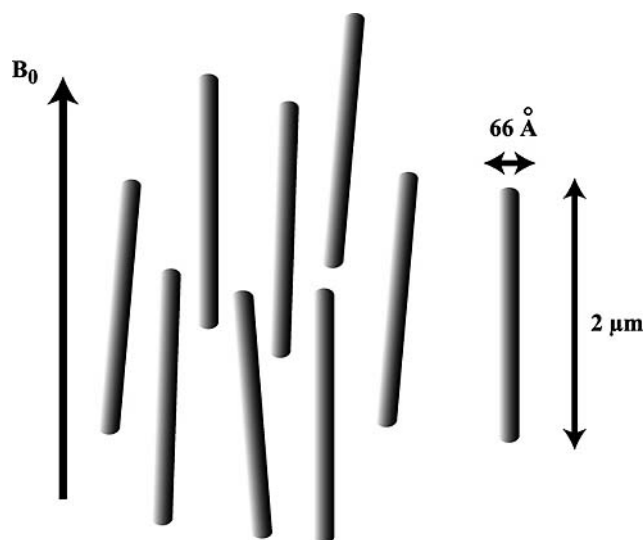


Figure II.16 : Schéma représentant l'alignement des phages dans un champ magnétique B_0 .

L'avantage des phages est qu'ils sont stables et posent peu de problèmes par rapport aux conditions expérimentales de l'échantillon. A pH supérieur à 5 ils sont chargés négativement (57) et l'alignement induit est majoritairement de nature électrostatique. Des concentrations en sels importantes ($\sim 100 \text{ mM}$) peuvent être utilisées (58) pour limiter les interactions électrostatiques entre la protéine et les phages. Néanmoins, de trop fortes concentrations en sels entraînent leur agrégation. Le degré d'alignement obtenu dépend de la concentration de phages (Figure II.17) et peut être suivi par la mesure du dédoublement quadrupolaire du D_2O .

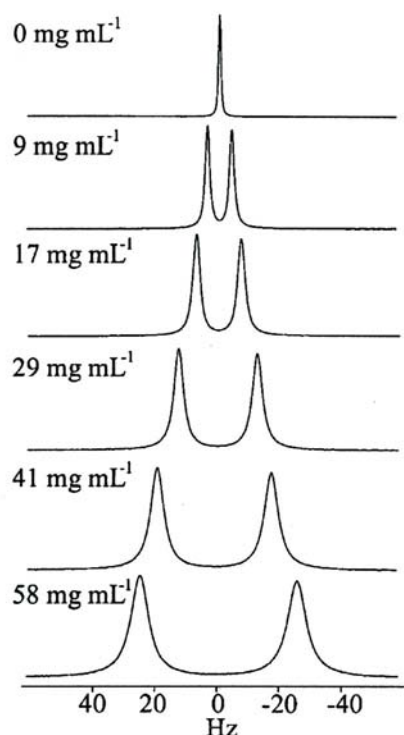


Figure II.17 : dédoublement quadrupolaire en fonction de la concentration en phages. (issu de (18))

Les fragments de membrane pourpre

Les membranes pourpres sont majoritairement constituées de bactériorhodopsine, une protéine membranaire constituée de 7 hélices α transmembranaires. Dans un champ magnétique intense, le plan des membranes pourpres s'oriente perpendiculairement au champ magnétique. L'alignement introduit est issu de deux composantes : une composante électrostatique et une composante stérique (41). L'influence la plus importante sur l'alignement provient de la composante électrostatique.

Les mélanges de polyéthylène glycols

Rückert et Otting ont introduit ces milieux en 2000 (38). Il s'agit de milieux composés d'un mélange d'alkyl-poly(éthylène glycol) (PEG) et d'hexanol dans l'eau. Bax et *al.* ont étudié la morphologie de ce milieu (12) et ont montré qu'il s'organise en phase lamellaire (Figure II.18).

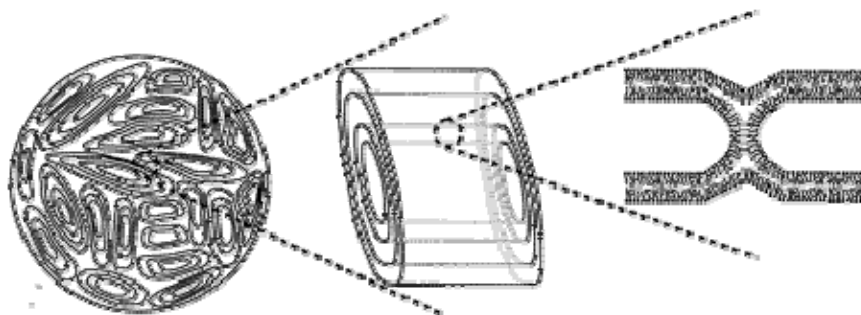


Figure II.18 : Représentation schématique de la morphologie de C_mE_n /hexanol dans une phase cristal liquide lamellaire (issue de (12)).

La surface du cristal liquide formé n'est pas chargée et l'alignement induit est donc stérique. L'avantage de ce milieu est qu'il est peu cher, stable dans le temps et facile d'utilisation. Différents mélanges peuvent être utilisés en fonction des conditions expérimentales imposées par l'échantillon (Figure II.19). Le facteur r correspond au rapport molaire C_mE_n /alcool. Les différents PEG sont notés C_mE_n où m est le nombre de carbones et n le nombre d'unités de glycol dans le poly(éthylène glycol).

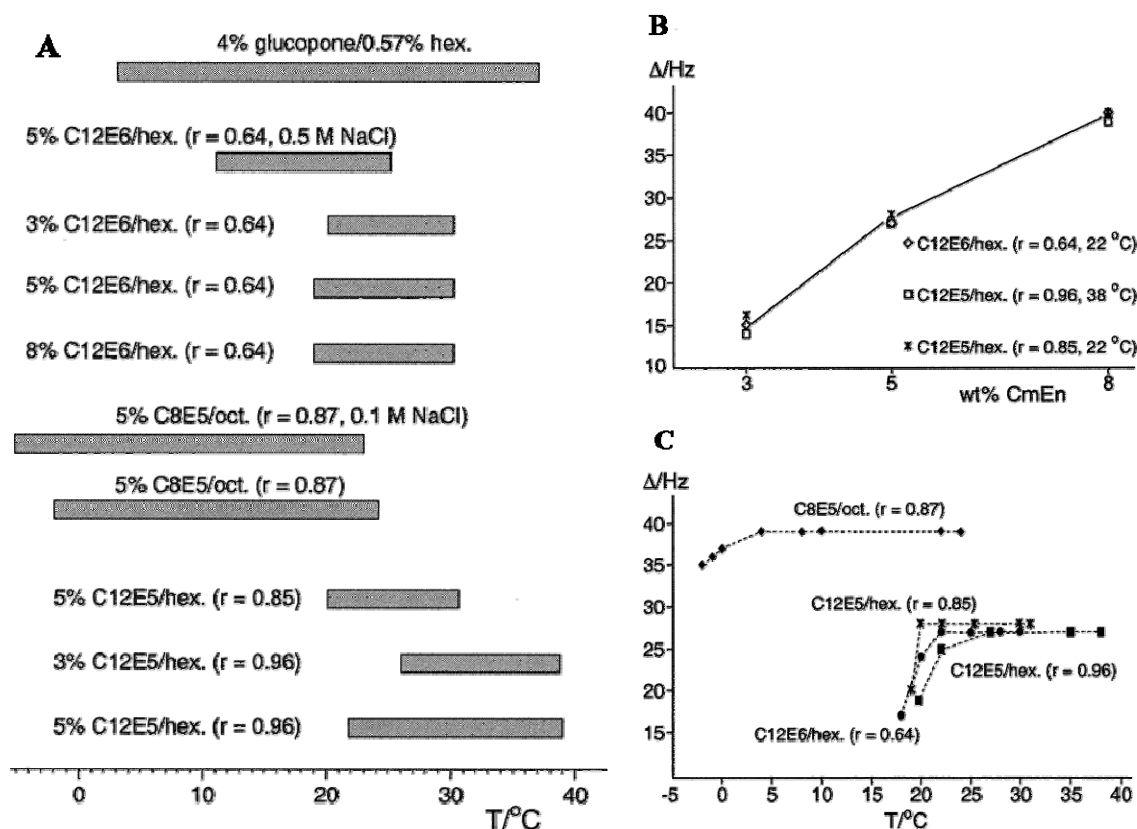


Figure II.19 : A) Gamme de température utilisable pour les mélanges afin d'obtenir une phase lamellaire stable. B) Dédoublage quadrupolaire du D₂O mesuré en fonction de la quantité de mélange C_mE_n /alcool/H₂O. C) Dédoublage quadrupolaire du D₂O mesuré en fonction de la température. (issue de (38))

Les gels de polyacrylamide

Les macromolécules peuvent également être alignées par un gel de polyacrylamide (19, 40, 50). La protéine doit d'abord diffuser dans le gel avant de le comprimer. A ce stade, la forme des pores du gel est aléatoire. La compression va induire un allongement des pores perpendiculairement à la pression appliquée. Lorsque la pression appliquée est longitudinale (Figure II.20A et B), l'allongement des pores va se faire perpendiculairement au champ magnétique. L'alignement induit dans ces conditions est faible. Une autre méthode de compression a été mise au point dans le groupe de Bax (Figure II.20C). Dans ce cas, la pression appliquée est radiale et vise à diminuer le diamètre du gel (7). Cette compression radiale crée des cavités parallèles au champ magnétique. Cette orientation des cavités va permettre de mesurer des couplages dipolaires résiduels deux fois plus importants que dans un gel comprimé longitudinalement.

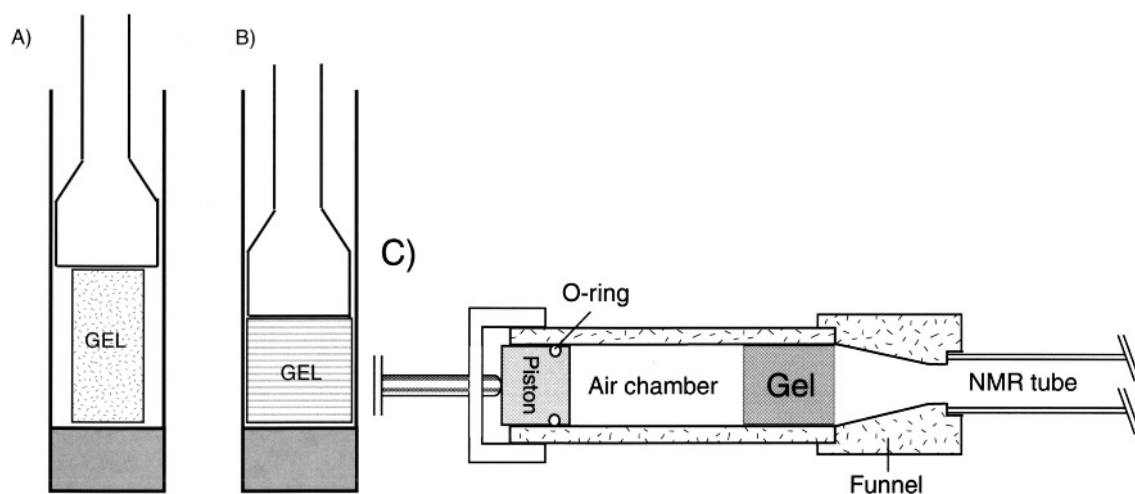


Figure II.20 : A) et B) Compression longitudinale à l'aide d'un piston du gel de polyacrylamide. C) Compression radiale du gel à l'aide du système développé par Chou et *al.* (7) (issue de (1)).

Les gels de polyacrylamide sont neutres et vont donc induire un alignement stérique. Néanmoins, des charges positives ou négatives peuvent être ajoutées si des problèmes d'interactions macromolécules / gel surviennent (27, 51).

II.2.3.7 Les couplages scalaires et les déplacements chimiques

Le couplage scalaire 3J permet d'accéder à l'angle dièdre θ ($\theta=\phi_i$ ou $\theta=\psi_i$) (Figure II.21) par la relation empirique de Karplus (20) (Figure II.22) :

$$^3J = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C$$

avec A, B et C des constantes déterminées empiriquement dont la valeur dépend des noyaux impliqués dans le couplage. Par exemple, dans le cas du couplage $^3J_{\text{HNH}\alpha}$, Pardi et *al.* (33) ont montré que l'équation de Karplus devient :

$$^3J_{\text{HNH}\alpha}(\phi) = 6.4 \cos^2(\phi - 60) - 1.3 \cos(\phi - 60) + 1.5$$

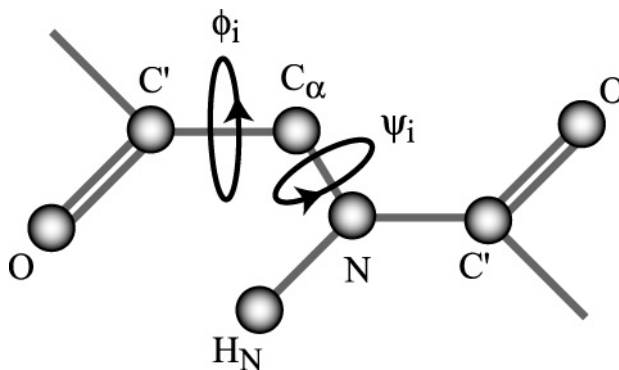


Figure II.21 : Angles de torsions phi (ϕ) et psi (ψ)

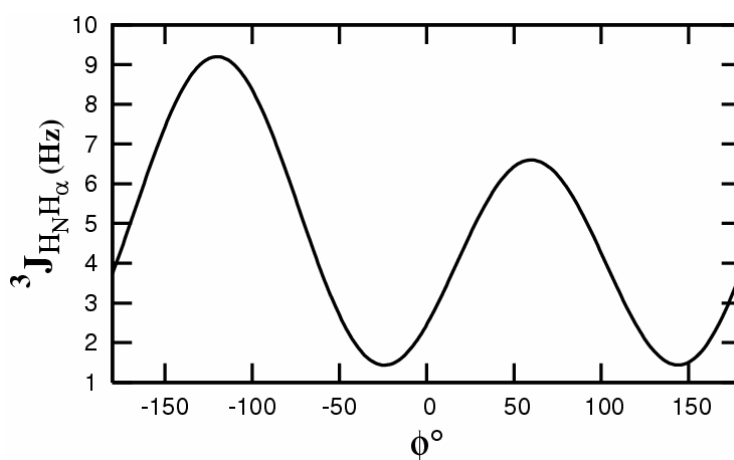


Figure II.22 : Courbe de Karplus dans le cas du couplage $^3J_{H_N H_\alpha}$

Comme on peut le voir, le couplage scalaire est dégénéré et une valeur de $^3J_{H_N H_\alpha}$ peut correspondre à plusieurs angles ϕ . Pour simplifier ce problème, on peut utiliser le programme TALOS qui utilise les déplacements chimiques des atomes H α , C α , C β , CO et N qui sont très sensibles à la conformation locale pour déterminer les angles ϕ_i et ψ_i (10).

II.2.4 Calcul de structure sous recuit simulé

Le calcul de structure est réalisé en utilisant des simulations de dynamique moléculaire pendant lesquelles l'espace conformationnel accessible est limité par des contraintes physiques (champs de force) et expérimentales (contraintes RMN). Il commence au départ avec une structure initiale définie ou par une répartition aléatoire des atomes. De l'énergie cinétique est donnée au système en augmentant la température et donc l'agitation thermique. Tous les atomes sont alors en mouvements. La température du système est ensuite lentement diminuée. Pendant cette phase, les atomes explorent l'espace conformationnel et perdent progressivement de l'énergie pour se trouver dans des puits de potentiels qui ont une énergie minimale et qui correspondent à des structures thermodynamiquement stables (Figure II.23).

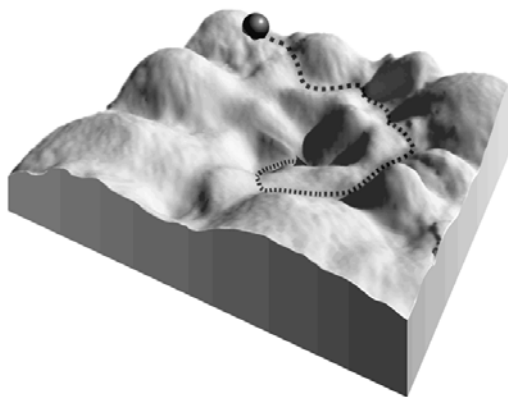


Figure II.23 : Exploration de l'espace conformationnel lors du calcul de structure (issue de « Making truth » de Thomas L.Brown). Durant le recuit simulé, le système peut atteindre plusieurs puits de potentiels intermédiaires puis en sortir avant d'atteindre un puit de potentiel dont l'énergie est minimale.

Durant le calcul, l'énergie du système est déterminée par des composantes physiques et expérimentales.

La composante physique dépend d'un champ de force qui décrit les propriétés géométriques des macromolécules biologiques (longueurs de liaisons, des angles...) en termes d'énergie potentielle d'interactions atomiques **covalentes** et **non covalentes**.

$$E_{\text{totale}} = E_{\text{covalentes}} + E_{\text{non covalentes}}$$

$$E_{\text{covalentes}} = E_{\text{liaison}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{dièdre}} + E_{\text{autre angle dièdre}}$$

$$E_{\text{non covalentes}} = E_{\text{Van der Waals}} + E_{\text{électrostatique}} + E_{\text{liaison hydrogène}}$$

La composante expérimentale provient de la violation des contraintes expérimentales déduites de l'analyse des différents spectres (angle dièdre, distances) et imposées dans le calcul de structure.

Le calcul de structure correspond en fait à une minimisation de la fonction d'énergie cible qui tient compte des paramètres du champ de force et des contraintes expérimentales :

$$E_{\text{cible}} = E_{\text{covalentes}} + E_{\text{non covalentes}} + E_{\text{exp}}$$

Toutes les contraintes (champ de force et contraintes expérimentales) vont diriger le système durant le calcul afin d'atteindre un minimum d'énergie et donc une structure stable.

Cette méthode ne permet pas d'obtenir une seule structure comme en cristallographie. En effet, la minimisation d'énergie sous contraintes est nettement sous déterminée par rapport au nombre de degrés de liberté. Elle doit donc être réalisée plusieurs fois afin de bien échantillonner tout l'espace conformationnel. A l'issue de cette étape, un ensemble de structure en accord avec les données expérimentales est obtenu.

De manière générale, la qualité de la structure obtenue dépendra de la **quantité et de la qualité** des contraintes expérimentales utilisées.

II.3 Etude de la dynamique d'une protéine par la relaxation des noyaux ^{15}N

Les informations sur la dynamique des protéines sont obtenues par la mesure de 3 paramètres expérimentaux : la vitesse de relaxation longitudinale \mathbf{R}_1 , la vitesse de relaxation transversale \mathbf{R}_2 et la relaxation croisée **NOE**. Le fait que les noyaux ^{15}N soient présents de manière homogène tout le long de la chaîne principale et que leur source principale de relaxation provienne du proton qui leur est attaché en font des sondes idéales.

II.3.1 Les paramètres R_1 et R_2

Après excitation des spins par une impulsion radiofréquence, le système va retourner à l'équilibre par le phénomène de relaxation. Ce retour à l'équilibre peut être décrit par une loi mono-exponentielle avec des vitesses caractéristiques R_1 et R_2 .

$$M_z(t) = M_{z_0} \cdot e^{-t.R_1}$$

$$\text{et } M_{xy}(t) = M_{xy_0} \cdot e^{-t.R_2}$$

où $M_z(t)$ et $M_{xy}(t)$ sont les composantes longitudinales et transversales de l'aimantation au temps t , M_{z0} et M_{xy0} sont ces composantes au temps $t=0$.

La mesure de ces paramètres se fait par la mesure des volumes ou des intensités des tâches de corrélation dans des expériences enregistrées avec des temps de relaxation différents. En ce qui concerne la mesure de R_2 , elle est indirecte. En effet, afin de s'affranchir des problèmes d'inhomogénéité du champ B_0 qui sont une source de relaxation et donc perturbent la mesure, on mesure le paramètre $R_{1\rho}$. Dans ce cas, un champ radiofréquence B_1 est appliqué dans le référentiel tournant selon l'axe x pendant le temps de mélange. Sa fréquence est proche de la fréquence de Larmor ω_0 et dans ce cas on parle de « spin lock ». L'aimantation ^{15}N va donc être verrouillée selon l'axe du champ effectif et n'évoluera que sous l'effet de la relaxation. Afin de tenir compte de l'écart de la fréquence de chaque spin par rapport à la porteuse, une correction est appliquée et la valeur de R_2 est déduite de celle de $R_{1\rho}$ par la relation :

$$R_{1\rho} = R_2 \cos^2\theta + R_1 \sin^2\theta \text{ avec } \theta = \left(\tan \frac{2\pi\Delta\nu}{\gamma_N B_1} \right)^{-1} \text{ où } \Delta\nu \text{ est la fréquence de l'offset (en Hz) et } |\gamma_N \cdot B_1| \text{ la}$$

puissance du « spin lock ».

II.3.2 Le paramètre NOE

Comme nous l'avons vu dans la section II.2.3.5, l'effet NOE correspond à un échange d'aimantation entre deux spins (I et S) proches dans l'espace lorsque les populations d'un des deux spins (par exemple I) sont perturbées par rapport à l'équilibre. Il en résulte une modification de l'intensité de la résonance du spin S. Pour rappel, l'effet NOE (ou facteur d'amplification) peut être connu par :

$$\text{NOE}_{IS} = \frac{S_{\text{sat}} - S_{\text{eq}}}{S_{\text{eq}}}$$

avec S_{eq} et S_{sat} les intensités du pic de résonance du spin S à l'équilibre et pendant la saturation du spin I.

D'un point de vue théorique, le NOE peut être défini comme le rapport de la vitesse de relaxation croisées σ_{IS} sur la vitesse de relaxation dipolaire longitudinale totale ρ_{IS} :

$$\text{NOE}_{IS} = \frac{\gamma_I}{\gamma_S} \frac{\sigma_{IS}}{\rho_{IS}} = \frac{\gamma_I}{\gamma_S} \left[\frac{W_2 - W_0}{W_0 + W_2 + 2W_1^S} \right]$$

où W_2 et W_0 correspondent aux vitesses de transitions à deux et zéro quanta respectivement et W_1^S à la vitesse de transition à un quanta du spin I (Figure II.24).

Comme on peut le constater, le signe du NOE dépend du signe des rapports gyromagnétiques des noyaux impliqués et de la différence ($W_2 - W_0$).

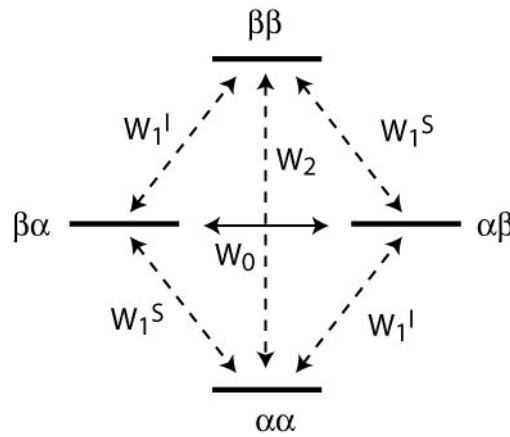


Figure II.24 : Transitions possibles dans un système à deux spins.

Les vitesses de transitions W_2, W_0 et W_1^S sont exprimées par :

$$W_0 \propto \gamma_I^2 \gamma_S^2 \left[\frac{2\tau_c}{r_{IS}^6 (1 + (\omega_S - \omega_I)^2 \tau_c^2)} \right]$$

$$W_2 \propto \gamma_I^2 \gamma_S^2 \left[\frac{12\tau_c}{r_{IS}^6 (1 + (\omega_S + \omega_I)^2 \tau_c^2)} \right]$$

$$W_1^S \propto \gamma_I^2 \gamma_S^2 \left[\frac{3\tau_c}{r_{IS}^6 (1 + \omega_S^2 \tau_c^2)} \right]$$

et sont donc dépendantes de la distance r_{IS} et du τ_c . Si la distance r_{IS} est connue (exemple liaison ^1H - $^{15}\text{N} \approx 1.01 \text{ \AA}$), alors le NOE va directement renseigner sur le τ_c du vecteur observé.

Dans le cas où le NOE hétéronucléaire est observé entre le ^1H (noyau saturé) et un noyau possédant un rapport gyromagnétique négatif (ex : ^{15}N), le NOE observé sera toujours négatif et aboutira à une diminution de l'intensité du signal. Le facteur de diminution dépendra du τ_c du vecteur comme on peut le voir Figure II.25 dans le cas du vecteur H-N.

D'un point de vue pratique, pour mesurer cet effet, on enregistre dans un premier temps une expérience où l'on irradie le ^1H pendant quelques secondes afin de rompre l'équilibre et de créer un état stationnaire (expérience de saturation). On regarde ensuite l'effet de cette perturbation sur l'aimantation longitudinale du spin ^{15}N . Une seconde expérience est enregistrée (expérience de référence) où l'irradiation est réalisée hors résonance afin de produire le même échauffement de l'échantillon que dans l'expérience de saturation. Le paramètre NOE est déterminé en faisant le rapport des intensités mesurées entre l'expérience de saturation et l'expérience de référence.

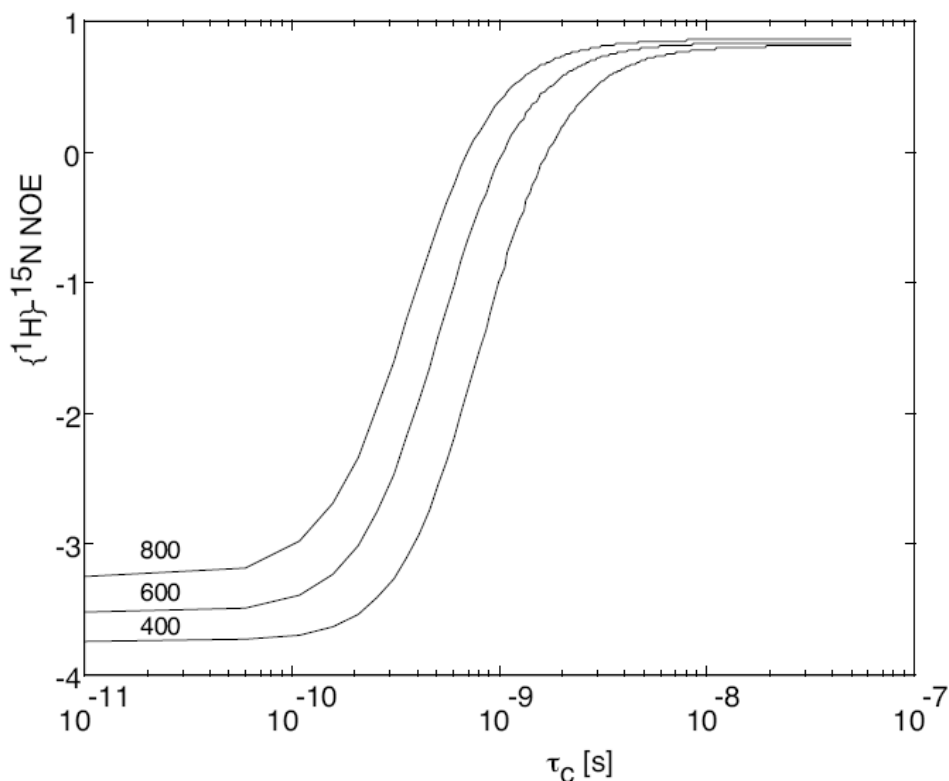


Figure II.25 : Variation du paramètre NOE ^1H - ^{15}N en fonction du τ_c du vecteur N-H. le NOE hétéronucléaire ^1H - ^{15}N permet d'identifier des mouvement dans la gamme $[10^{-10} : 10^{-8}] \text{ s}$.

II.3.3 Extraction des paramètres de dynamique

Ceux-ci sont déterminés à l'aide de l'approche sans modèle géométrique développée par Lipari et Szabo (8, 25). Cette approche sépare la diffusion rotationnelle globale de la molécule des mouvements internes plus rapides. Ces deux phénomènes sont considérés comme indépendants car les échelles de temps de ces mouvements sont différentes d'au moins un ordre de grandeur. Le temps de corrélation de la molécule τ_c se situe dans la gamme des ns alors que les mouvements internes τ_i vont de la ps à la ns.

Les paramètres de dynamique sont déterminés à partir de la fonction de densité spectrale $J(\omega)$ (Figure II.26) qui, à partir du modèle de Lipari et Szabo, est de la forme :

$$J(\omega) = S^2 \frac{\tau_c}{1 + (\omega\tau_c)^2} + (1 - S^2) \frac{\tau_i}{1 + (\omega\tau_i)^2}$$

avec $\tau_c^{-1} = \tau_e^{-1} + \tau_i^{-1}$ où τ_c est le temps de corrélation global de la molécule, τ_e le temps de corrélation effectif, τ_i le temps de corrélation pour les mouvements internes et S^2 le paramètre d'ordre qui donne une mesure de l'amplitude des mouvements internes (plus S^2 tend vers 1 plus le mouvement de la liaison est restreint). Cette fonction permet de connaître l'amplitude des mouvements des vecteurs étudiés dans la molécule.

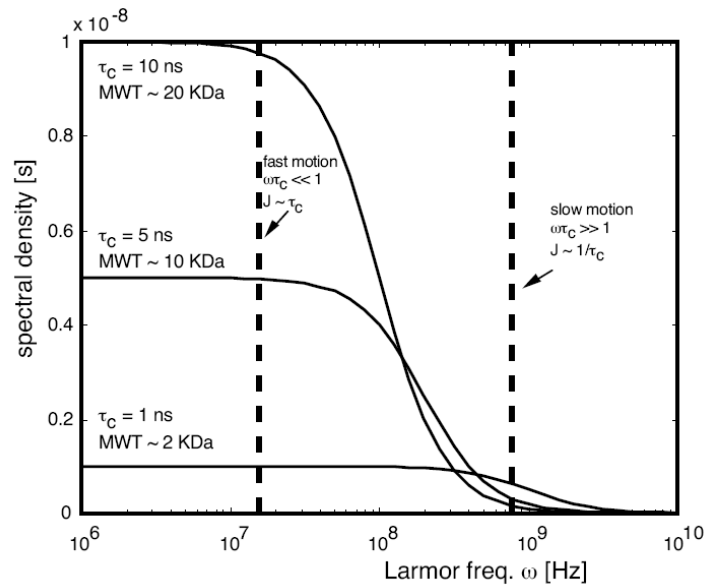


Figure II.26 : Fonction de densité spectrale obtenue en fonction du temps de corrélation de la molécule.

La détermination de cette fonction est possible car les 3 paramètres mesurés R_1 , R_2 et NOE l'échantillonnent à 5 fréquences différentes (35).

En effet :

$$R_1 = d^2 [J(\omega_N - \omega_H) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N) + 6J(\omega_H)] + c^2 J(\omega_N)$$

$$R_2 = \frac{d^2}{2} [4J(0) + J(\omega_N - \omega_H) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N) + 6J(\omega_H)] + \frac{c^2}{6} [4J(0) + J(\omega_N)] + R_{exc}$$

$$NOE = 1 + \frac{\gamma_H d^2}{\gamma_N R_1} [6J(\omega_N + \omega_H) - J(\omega_H - \omega_N)]$$

$$\text{avec } d^2 = (1/10) \cdot \gamma_H^2 / \gamma_N^2 (h/2\pi)^2 \cdot (r_{NH}^{-3})^2 \text{ et } c^2 = (2/15) \omega_N^2 (\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})$$

h est la constante de Planck, γ_H et γ_N sont les rapports gyromagnétiques du 1H et de ^{15}N , ω_H et ω_N sont les fréquences de Larmor 1H et ^{15}N et r_{NH} est la distance internucléaire. σ_{\parallel} - σ_{\perp} sont les composants parallèle et perpendiculaire du tenseur de déplacement chimique de ^{15}N .

En faisant l'approximation $J(\omega_H \pm \omega_N) \approx J(\omega_H)$ du fait que $\gamma_N \approx -0,1 \gamma_H$, on obtient un système de 3 équations à 3 inconnues que l'on peut résoudre.

Pour une molécule ayant une diffusion isotrope, en l'absence de mouvements internes et d'échange conformationnel, le terme en $(1-S^2)$ tend vers 0 et la fonction de densité spectrale devient :

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{S^2 \tau_c}{1 + (\omega \tau_c)^2}$$

Dans ce cas, le rapport R_2/R_1 est indépendant du paramètre d'ordre et permet de déterminer le temps de corrélation global τ_c de la molécule (22).

Dans le cas d'une diffusion anisotrope, le traitement est un peu plus compliqué. Il devient nécessaire d'avoir une structure pour déterminer le tenseur de diffusion et extraire les paramètres de dynamiques.

La détermination des paramètres de dynamique peut être faite par le programme TENSOR2 (11).

Références bibliographiques

1. Bax A. 2003. Weak alignment offers new NMR opportunities to study protein structure and dynamics. *Protein Sci* 12: 1
2. Bax A, Kontaxis G, Tjandra N. 2001. Dipolar couplings in macromolecular structure determination. *Methods Enzymol* 339: 127
3. Bax A, Tjandra N. 1997. High-resolution heteronuclear NMR of human ubiquitin in an aqueous liquid crystalline medium. *J Biomol NMR* 10: 289
4. Beraud S. 2002. *Caractérisations Structurale et Dynamique par Résonance Magnétique Nucléaire d'une Protéine de 25 kDa : la Méthionine Sulfoxyde Réductase d'Erwinia chrysanthemi*. Grenoble UJF
5. Brutscher B, Cordier F, Simorre JP, Caffrey M, Marion D. 1995. High-resolution 3D HNCOCA experiment applied to a 28 kDa paramagnetic protein. *J Biomol NMR* 5: 202
6. Cavanagh J, Fairbrother W, Palmer A, Skelton N. 1996. *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*
7. Chou JJ, Gaemers S, Howder B, Louis JM, Bax A. 2001. A simple apparatus for generating stretched polyacrylamide gels, yielding uniform alignment of proteins and detergent micelles. *J Biomol NMR* 21: 377
8. Clore GM, Driscoll PC, Wingfield PT, Gronenborn AM. 1990. Analysis of the backbone dynamics of interleukin-1 beta using two-dimensional inverse detected heteronuclear ¹⁵N-¹H NMR spectroscopy. *Biochemistry* 29: 7387
9. Clore GM, Starich MR, Gronenborn AM. 1998. Measurement of residual dipolar couplings of macromolecules aligned in the nematic phase of a colloidal suspension of rod-shaped viruses. *J Am Chem Soc* 120: 10571
10. Cornilescu G, Delaglio F, Bax A. 1999. Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J Biomol NMR* 13: 289
11. Dosset P, Hus JC, Blackledge M, Marion D. 2000. Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data. *J Biomol NMR* 16: 23
12. Gaemers S, Bax A. 2001. Morphology of three lyotropic liquid crystalline biological NMR media studied by translational diffusion anisotropy. *J Am Chem Soc* 123: 12343
13. Gardner KH, Kay LE. 1998. The use of ²H, ¹³C, ¹⁵N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27: 357
14. Gardner KH, Rosen MK, Kay LE. 1997. Global folds of highly deuterated, methyl-protonated proteins by multidimensional NMR. *Biochemistry* 36: 1389

15. Goto NK, Gardner KH, Mueller GA, Willis RC, Kay LE. 1999. A robust and cost-effective method for the production of Val, Leu, Ile (δ 1) methyl-protonated ^{15}N -, ^{13}C -, ^2H -labeled proteins. *J Biomol NMR* 13: 369
16. Grzesiek S, Anglister J, Ren H, Bax A. 1993. ^{13}C line narrowing by ^2H decoupling in $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins. Application to triple resonance 4DJ connectivity of sequential amides. *J Am Chem Soc* 115: 4369–70
17. Hansen MR, Hanson P, Pardi A. 2000. Filamentous bacteriophage for aligning RNA, DNA, and proteins for measurement of nuclear magnetic resonance dipolar coupling interactions. *Methods Enzymol* 317: 220
18. Hansen MR, Mueller L, Pardi A. 1998. Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions. *Nat Struct Biol* 5: 1065
19. Ishii Y, Markus MA, Tycko R. 2001. Controlling residual dipolar couplings in high-resolution NMR of proteins by strain induced alignment in a gel. *J Biomol NMR* 21: 141
20. Karplus M. 1959. Contact electron spin coupling of nuclear magnetic moments. *J. Phys. Chem.* 30: 11
21. Katz JJ, Crespi HL. 1966. Deuterated Organisms : Cultivation and Uses. *Science* 151: 1187
22. Kay LE, Torchia DA, Bax A. 1989. Backbone dynamics of proteins as studied by ^{15}N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry* 28: 8972
23. Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM, Parrish RG, Wyckoff H, Phillips DC. 1958. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* 181: 662
24. Koharudin LM, Bonvin AM, Kaptein R, Boelens R. 2003. Use of very long-distance NOEs in a fully deuterated protein: an approach for rapid protein fold determination. *J Magn Reson* 163: 228
25. Lipari G, A S. 1982. Model-free approach to the interpretation of of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* 104: 4546
26. Losonczi JA, Prestegard JH. 1998. Improved dilute bicelle solutions for high-resolution NMR of biological macromolecules. *J Biomol NMR* 12: 447
27. Meier S, Haussinger D, Grzesiek S. 2002. Charged acrylamide copolymer gels as media for weak alignment. *J Biomol NMR* 24: 351
28. Morelle N, Brutscher B, Simorre JP, Marion D. 1995. Computer assignment of the backbone resonances of labelled proteins using two-dimensional correlation experiments. *J. Biomol. NMR* 5: 154
29. Morgan WD, Kragt A, Feeney J. 2000. Expression of deuterium-isotope-labelled protein in the yeast *pichia pastoris* for NMR studies. *J Biomol NMR* 17: 337

30. Nietlispach D, Ito Y, Laue ED. 2002. A novel approach for the sequential backbone assignment of larger proteins: selective intra-HNCA and DQ-HNCA. *J Am Chem Soc* 124: 11199
31. Ottiger M, Bax A. 1998. Characterization of magnetically oriented phospholipid micelles for measurement of dipolar couplings in macromolecules. *J Biomol NMR* 12: 361
32. Ottiger M, Bax A. 1999. Bicelle-based liquid crystals for NMR-measurement of dipolar couplings at acidic and basic pH values. *J Biomol NMR* 13: 187
33. Pardi A, Billeter M, Wuthrich K. 1984. Calibration of the angular dependence of the amide proton-C alpha proton coupling constants, $^3J_{HN\alpha}$, in a globular protein. Use of $^3J_{HN\alpha}$ for identification of helical secondary structure. *J Mol Biol* 180: 741
34. Peng JW, Lepre CA, Fejzo J, Abdul-Manan N, Moore JM. 2001. Nuclear Magnetic Resonance Based Approaches for Lead Generation in Drug Discovery. *Methods in Enzymology* 338: 202
35. Peng JW, Wagner G. 1992. Mapping of the spectral densities of N-H bond motions in eglin c using heteronuclear relaxation experiments. *Biochemistry* 31: 8571
36. Qin J, Vinogradova O, Gronenborn AM. 2001. Protein-protein interactions probed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Methods Enzymol* 339: 377
37. Ramesh V, Frederick RO, Syed SE, Gibson CF, Yang JC, Roberts GC. 1994. The interactions of Escherichia coli trp repressor with tryptophan and with an operator oligonucleotide. NMR studies using selectively ^{15}N -labelled protein. *Eur J Biochem* 225: 601
38. Rückert M, Otting G. 2000. Alignment of Biological Macromolecules in Novel Nonionic Liquid Crystalline Media for NMR Experiments. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 7793
39. Sanders CR, 2nd, Schwonek JP. 1992. Characterization of magnetically orientable bilayers in mixtures of dihexanoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylcholine by solid-state NMR. *Biochemistry* 31: 8898
40. Sass HJ, Musco G, Stahl SJ, Wingfield PT, Grzesiek S. 2000. Solution NMR of proteins within polyacrylamide gels: diffusional properties and residual alignment by mechanical stress or embedding of oriented purple membranes. *J Biomol NMR* 18: 303
41. Sass J, Cordier F, Hoffmann A, Rogowski M, Cousin A, et al. 1999. Purple Membrane Induced Alignment of Biological Macromolecules in the Magnetic Field. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 2047
42. Sibille N. 2003. *Etude par Résonance Magnétique Nucléaire du domaine FMN de la Sulfite Réductase d'Escherichia coli*. Grenoble
43. Slupsky CM, Boyko RF, Booth VK, Sykes BD. 2003. Smartnotebook: a semi-automated approach to protein sequential NMR resonance assignments. *J Biomol NMR* 27: 313
44. Szyperski T, Braun D, Fernandez C, Bartels C, Wüthrich K. 1995. COHNCA. *J. Magn. Res.* B108: 197

45. Tjandra N, Bax A. 1997. Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium. *Science* 278: 1111
46. Tugarinov V, Choy WY, Orekhov VY, Kay LE. 2005. Solution NMR-derived global fold of a monomeric 82-kDa enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 622
47. Tugarinov V, Kay LE. 2003. Ile, Leu, and Val methyl assignments of the 723-residue malate synthase G using a new labeling strategy and novel NMR methods. *J Am Chem Soc* 125: 13868
48. Tugarinov V, Kay LE, Ibraghimov I, Orekhov VY. 2005. High-resolution four-dimensional ¹H-¹³C NOE spectroscopy using methyl-TROSY, sparse data acquisition, and multidimensional decomposition. *J Am Chem Soc* 127: 2767
49. Tugarinov V, Muhandiram R, Ayed A, Kay LE. 2002. Four-dimensional NMR spectroscopy of a 723-residue protein: chemical shift assignments and secondary structure of malate synthase g. *J Am Chem Soc* 124: 10025
50. Tycko R, Blanco FJ, Y I. 2000. Alignment of Biopolymers in Strained Gels: A New Way To Create Detectable Dipole-Dipole Couplings in High-Resolution Biomolecular NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 9340
51. Ulmer TS, Ramirez BE, Delaglio F, Bax A. 2003. Evaluation of backbone proton positions and dynamics in a small protein by liquid crystal NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* 125: 9179
52. Venters RA, Farmer BT, 2nd, Fierke CA, Spicer LD. 1996. Characterizing the Use of Perdeuteration in NMR Studies of Large Proteins: ¹³C, ¹⁵N and ¹H Assignments of Human Carbonic Anhydrase II. *J Mol Biol* 264: 1101–1116
53. Walters KJ, Ferentz AE, Hare BJ, Hidalgo P, Jasanoff A, et al. 2001. Characterizing protein-protein complexes and oligomers by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Methods Enzymol* 339: 238
54. Williamson MP, Havel TF, Wuthrich K. 1985. Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by ¹H nuclear magnetic resonance and distance geometry. *J Mol Biol* 182: 295
55. Wishart DS, Sykes BD. 1994. The ¹³C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical-shift data. *J Biomol NMR* 4: 171
56. Zimmerman DE, Kulikowski CA, Huang Y, Feng W, Tashiro M, et al. 1997. Automated analysis of protein NMR assignments using methods from artificial intelligence. *J Mol Biol* 269: 592
57. Zimmermann K, Hagedorn H, Heuck CC, Hinrichsen M, Ludwig H. 1986. The ionic properties of the filamentous bacteriophages Pfl and fd. *J Biol Chem* 261: 1653
58. Zweckstetter M, Bax A. 2001. Characterization of molecular alignment in aqueous suspensions of Pfl bacteriophage. *J Biomol NMR* 20: 365

Chapitre III

Etude structurale du dimère de $Zn_S FUR_D$ d'*E.coli* par Résonance Magnétique Nucléaire

III.1 Caractérisation préliminaire de FUR d'E.coli

III.1.1 Analyse de la séquence primaire de FUR

L'analyse de la séquence primaire a été réalisée sur le site « EXPASY » avec l'outil « ProtParam » (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/proparam>).

Séquence :

```

      1      11      21      31      41      51
      |      |      |      |      |      |
1  TDNNTALKKA GLKVTLPRLK ILEVLQEPDN HHVSAEDLYK RLIDMGEEIG LATVYRVLNQ
61 FDDAGIVTRH NFEGGKSVFE LTQQHHHDHL ICLDCGKVIE FSDDSI EARQ REIAAKHGIR
121 LTNHSLYLYG HCAEGDCRED EHAHEGK
    
```

Nombre d'acides aminés: 147

Poids moléculaire: 16663.6 Da

pI: 5.68 (théorique) / 5,85 (expérimental, (28))

Composition en acides aminés :

Acides aminés	Code	Nombre	%	Acides aminés	Code	Nombre	%
Ala	A	10	6.8	Leu	L	16	10.8
Arg	R	8	5.4	Lys	K	9	6.1
Asn	N	6	4.1	Met	M	1	1.4
Asp	D	12	8.1	Phe	F	4	2.7
Cys	C	4	2.7	Pro	P	2	1.4
Gln	Q	5	3.4	Ser	S	5	3.4
Glu	E	14	9.5	Thr	T	7	4.7
Gly	G	11	7.4	Trp	W	0	0.0
His	H	12	8.1	Tyr	Y	4	2.7
Ile	I	9	6.1	Val	V	8	5.4

Tableau III.1 : Composition en acides aminés d'E.coli FUR.

FUR d'E.coli possède de nombreux résidus hydrophobes contenant des méthyles (51 résidus). Ces derniers se situent dans les cœurs hydrophobes des protéines afin de limiter leur interaction avec le solvant et sont donc importants pour le repliement de la macromolécule. Ils pourront permettre d'obtenir des informations de proximité dans l'espace des chaînes latérales par l'attribution des NOEs méthyles-méthyles.

Une prédiction de structure secondaire réalisée précédemment à l'aide du serveur JPred a indiqué que la protéine était bien structurée *a priori* (Figure III.1).



Figure III.1 : Prédiction de structure secondaire de FUR d'*E.coli* réalisée sur JPred (5, 13)

Ces premières données étant encourageantes pour lancer une étude RMN, un premier échantillon marqué ^{15}N a été préparé afin de vérifier l'état de structuration de la protéine.

III.1.2 Tests préliminaires RMN de FUR d'*E.coli*

Avant l'obtention du premier échantillon RMN, la mise au point des conditions expérimentales (pH et concentration en sels) ont nécessité un travail important réalisé par Benoit D'Autréaux qui était alors en thèse dans le laboratoire PMB. Aux fortes concentrations nécessaires pour la RMN, FUR oligomérise avec un K_d de l'ordre du mM en tétramères et formes de plus haut poids moléculaire diminuant la quantité de FUR dimère dans l'échantillon (6). En effet, ces formes sont invisibles en RMN du fait de l'augmentation de la taille du complexe ($M > 72$ kDa) et donc de la largeur des raies. Cet équilibre dimère vers oligomère peut être ralenti par l'ajout de fortes concentrations en sels comme 500 mM de chlorure de potassium (6). D'autre part, le pH joue également un rôle important. L'oligomérisation est diminuée de façon optimale à pH 8 (6) mais ce pH étant trop basique pour la RMN (nécessité d'avoir un pH acide ou neutre pour limiter l'échange proton amide/ H_2O), nous avons décidé de travailler à pH 7.5 et à 25°C. L'échantillon RMN est préparé en anaérobie (sous argon) dans du tampon MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7.5 contenant du DTT à une concentration de 10 mM. L'ajout de DTT permet de prévenir l'oxydation des cystéines qui jouent un rôle important dans la stabilisation du dimère comme nous le verrons dans le chapitre suivant. Dans ces conditions, l'échantillon peut être stable pendant 6 mois lorsqu'il est conservé à 6°C.

Un premier spectre HSQC ^1H - ^{15}N de Zn_5FUR_D a pu être enregistré. Cette expérience permet de corréler le proton et l'azote du groupe amide. Comme tous les résidus possèdent une liaison amide, exceptés le premier et les prolines, le spectre doit comporter autant de pics que de résidus en dehors des résonances des chaînes latérales des glutamines et des asparagines. Dans notre cas, on dénombre 150 pics (en dehors des chaînes latérales) ce qui est proche du nombre de résidus d'un monomère. Ceci indique que le dimère est symétrique.

La bonne dispersion des résonances dans les deux dimensions indique que la protéine est bien structurée. La région en bas à gauche du spectre correspond à une zone où résonnent les résidus en brins β .

L'observation de résonances dans cette région suggère la présence de brin β dans la protéine. La région centrale du spectre est plus encombrée. Cet encombrement peut provenir des résidus appartenant à des zones non structurées de la protéine ou aux résidus organisés en hélice α .

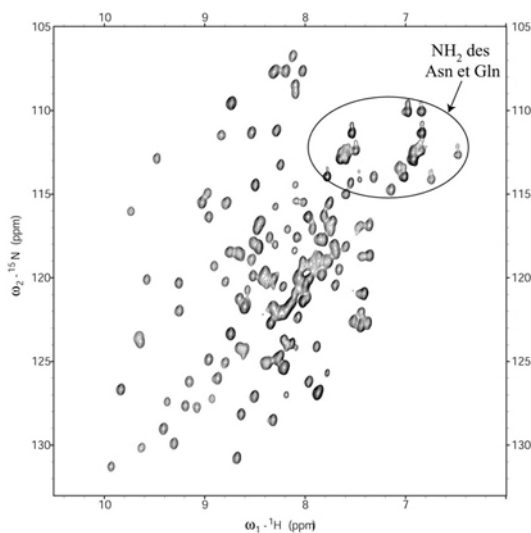


Figure III.2 : Spectre HSQC ^1H - ^{15}N de $\text{Zn}_5\text{FUR}_\text{D}$ à 2,6 mM dans MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7.5 DTT 10 mM à 298 K. Le spectre montre une bonne dispersion des résonances indiquant que la protéine est structurée. On dénombre ~150 pics sans compter les NH_2 des chaînes latérales des Asn et Gln correspondant approximativement au nombre de résidus par monomère indiquant que le dimère est symétrique.

Le spectre HSQC ^1H - ^{15}N se révélant prometteur, l'étude RMN a donc pu débuter. Différents échantillons de protéines ont été préparés au fur et à mesure de l'étude pour satisfaire les besoins des expériences RMN.

III.2 Préparation des échantillons $\text{Zn}_5\text{FUR}_\text{D}$ d'E.coli

Les conditions de culture des bactéries BL21(DE3) permettant la surproduction de FUR dans un milieu marqué minimum (M9) ou commercial et riche (« Silantes OD2 ») sont expliquées dans la section Matériels et Méthodes de même que le protocole de purification.

Brièvement, le protocole de purification contient deux étapes de chromatographies. La première permet la séparation de FUR des protéines contaminantes grâce à sa capacité de fixer des métaux bivalents du fait de la présence de 12 histidines. Cette séparation est réalisée grâce à une colonne d'affinité Hitrap Chelating (Amersham Biosciences) sur laquelle a été chargée du zinc. A l'issue de cette étape, la protéine est presque pure sur gel SDS-PAGE. Quelques protéines contaminantes subsistent mais surtout la protéine FUR obtenue se retrouve dans un mélange de différentes formes oligomériques. La seconde étape permet de séparer des différents oligomères par filtration sur gel en utilisant une Superdex 75 16/60 (Amersham Biosciences) (Figure III.3A). La protéine $\text{Zn}_5\text{FUR}_\text{D}$ obtenue est alors pure (Figure III.3B).

La proportion des différentes formes oligomériques varie selon les purifications. Néanmoins, la proportion de monomère peut être augmentée par l'ajout d'EDTA 100 mM au lieu de 10 mM dès le début de la purification.

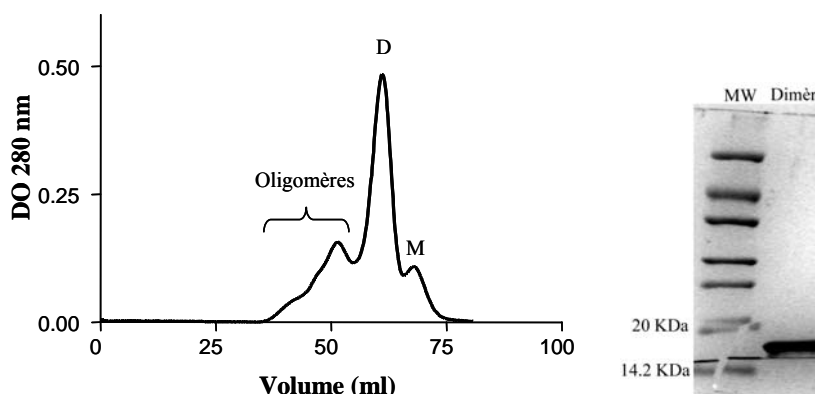


Figure III.3 : A) Profil d'élution des différents oligomères par filtration sur gel (Superdex HR 16/60) de FUR d'*E.coli* après une première étape de purification par chromatographie d'affinité. Le pic annoté D correspond au pic de dimère (64,5 mL poids apparent de 35 kDa) et le pic M au pic de monomère (72 mL poids apparent de 22 kDa). Les fractions oligomères contiennent du FUR sous forme tétramère et plus. B) gel SDS-PAGE montrant que la protéine FUR obtenue à l'issue de la purification est pure.

Différents marquages dans le cadre de cette étude ont été réalisés et sont résumés dans le Tableau III.2

Marquage	Sources isotopiques utilisées
^{15}N	$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$
^{15}N - ^{13}C	$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, ^{13}C -glucose
^{15}N - ^{13}C - ^2H	$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, ^{13}C -glucose, D_2O 90%
^{15}N - ^{13}C - ^2H	Milieu riche et commercial Silantes (lysats bactériens)

Tableau III.2 : Les différents marquages réalisés pour l'étude par RMN d'*E.coli* FUR.

Les quantités de FUR dimère obtenues à l'issue d'une purification varient entre 15 et 20 mg de dimère par litre de culture en milieu minimum.

III.3 Attribution des résonances de Zn_5FUR_D

III.3.1 Attribution de la chaîne principale et détermination des structures secondaires

La stratégie d'attribution décrite dans le chapitre 2 a permis d'attribuer 91 % des résonances de la chaîne principale. Les expériences ont été enregistrées sur l'échantillon triplement marqué et deutéré à ~50%. L'attribution des N-H n'a pu être faite pour les 4 premiers résidus ainsi que pour les résidus V67, G74, H85, H86, D104, S105 et K116. Les premiers résidus généralement flexibles sont probablement en échange conformationnel ce qui pourrait expliquer la difficulté de les attribuer. Les histidines 85 et 86 sont

le même noyau dans une structure en pelote statistique (« random coil ») $\delta_{\text{random coil}}$ (le $\delta_{\text{random coil}}$ est caractéristique d'un acide aminé donné).

Plusieurs résidus successifs avec un delta significativement positif ($\text{delta} > 0,5$) forment une hélice α . Plusieurs résidus successifs avec un delta significativement négatif ($\text{delta} < -0,5$) forment un brin β . L'interprétation simultanée des données obtenues pour les noyaux CO et C α a permis de délimiter approximativement les structures secondaires (Figure III.5). Les déplacements chimiques $^{13}\text{C}\beta$ n'ont pas été utilisés car leur utilisation permet seulement de détecter les brins β .

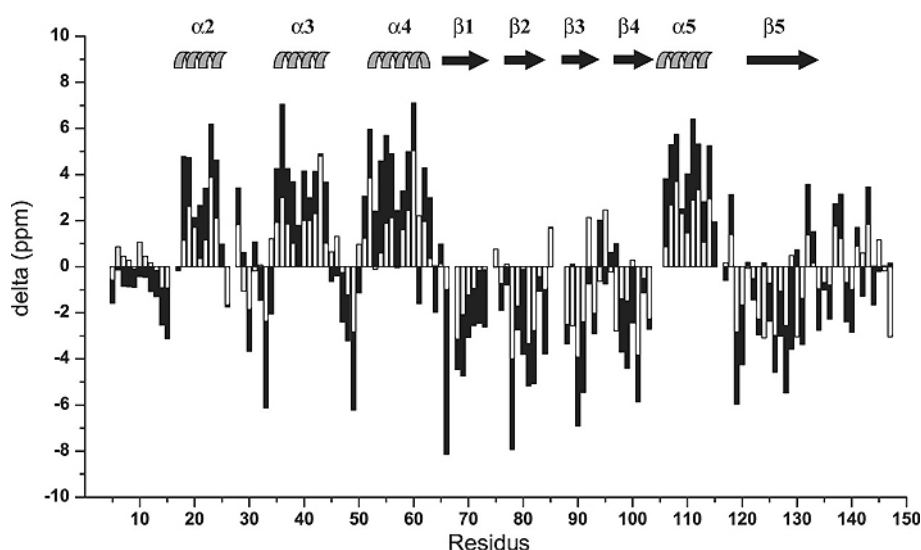


Figure III.5 : Superposition des valeurs de déplacement chimique secondaire ($\text{delta} = \delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{random coil}}$) obtenues pour les noyaux CO (barres vides) et C α (barres pleines) du dimère. Plusieurs résidus successifs ayant un delta positif sont organisés en hélice α et plusieurs résidus successifs ayant un delta négatif sont organisés en brin β . La troisième hélice est l'hélice supposée de reconnaissance de l'ADN.

Zn₅FUR_D possède donc 4 hélices α (résidus 18 à 24, 35 à 44, 51 à 62, et 106 à 114) et 5 brins β (résidus 66 à 71, 77 à 82, 88 à 91, 97 à 102, et 119 à 131). On peut noter l'absence de l'hélice α 1 prédite (extrémité N-terminale). Le fait que les prédictions ne puissent prendre en compte des interactions tertiaires et quaternaires peut expliquer ce phénomène (26).

Par analogie avec la structure cristallographique de Zn_RZn₅FUR_D de *P.aeruginosa*, les éléments de structures secondaires sont numérotés de la manière suivante : α 2, α 3, α 4, β 1, β 2, β 3, β 4, α 5, β 5.

Comme précédemment prédit (13), les 3 hélices α 2, α 3 et α 4 ainsi que le feuillet β 1/ β 2 suggèrent la présence d'un motif hélice-coude-hélice ailé.

III.3.2 Attribution des résonances des chaînes latérales

La méthode d'attribution décrite dans le chapitre 2 n'a malheureusement pas permis d'attribuer plus de 40 % de l'ensemble des résonances des chaînes latérales. Les expériences H(CCO)NH-TOCSY, (H)C(CO)NH-TOCSY ont été enregistrées sur l'échantillon triplement marqué et deutéré à ~50%. Cet échantillon est d'après Nietlispach et *al.* optimal pour ce type d'expérience (21). En effet, il faut des ^1H pour réaliser un INEPT vers les ^{13}C mais il n'en faut pas trop pour limiter la relaxation des carbones. Néanmoins, les problèmes de relaxation dominant dans notre cas et ne permettent pas d'obtenir d'expériences TOCSY de bonne qualité, de nombreux systèmes de spins n'étant pas observables. Le transfert d'aimantation se réalise correctement dans les régions non structurées mais beaucoup de systèmes de spins sont incomplets pour les résidus situés dans les zones structurées (observation des $\text{C}\alpha$ et $\text{C}\beta$ seulement) notamment pour les résidus à longues chaînes aliphatiques.

Comme il n'est pas possible d'attribuer la totalité des résonances des chaînes latérales, nous nous sommes intéressés à l'attribution des résonances des méthyles qui peuvent fournir des informations précieuses pour la détermination du repliement global d'une protéine (10, 24).

Les méthyles ont des propriétés de relaxation intéressantes dues à leur rotation rapide. Cette rotation permet d'avoir une largeur de raie faible et, sachant qu'ils portent 3 protons chimiquement équivalents (même déplacement chimique), le signal obtenu est plus intense que celui des autres groupes chimiques. A partir de l'échantillon ^{15}N - ^{13}C 100% protoné, la majorité des méthyles a pu être attribuée (Tableau III.3). Les leucines ont posé des problèmes puisque seulement la moitié des méthyles a pu être attribuée. Ces difficultés sont dues aux superpositions des résonances des méthyles qui compliquent l'attribution.

résidu	Nombre	attribués	Non attribués	% attribution
Isoleucine	9	21, 43, 49, 66, 99, 106, 113, 119	91	89
Leucine	16	7, 12, 19, 22, 38, 58, 81, 128	16, 25, 42, 51, 90, 93, 121, 126	50
Alanine	10	6, 10, 35, 52, 64, 108, 114, 115, 133, 143		100
Méthionine	1		45	0
Valine	8	14, 24, 33, 54, 57, 67, 78, 98		100
Thréonine	7	5, 15, 53, 68, 82, 122	1	86

Tableau III.3 : Résidus contenant des méthyles.

Dans le but d'obtenir plus d'informations structurales et de pouvoir déterminer la structure de la protéine (topologie, contraintes permettant d'avoir une idée du repliement), nous avons étudié les NOEs entre les protons amides et les NOEs méthyles-méthyles ainsi que les couplages dipolaires résiduels.

III.4 Collection des contraintes structurales

III.4.1 Analyse des NOEs observés pour le dimère

L'attribution de la chaîne principale a été confirmée par l'analyse des NOEs entre protons amides obtenus respectivement à partir des expériences 3D ^1H - ^{15}N -NOESY-HSQC (éditée ^1H) et 3D ^1H - ^{15}N -HSQC-NOESY-HSQC (éditée ^{15}N). Ces expériences permettent de vérifier les connectivités entre résidus successifs par l'observation des NOEs H_N - H_N du résidu (i) avec les résidus (i-1) et (i+1) (Figure III.6). Elles ont été enregistrées sur l'échantillon hautement deutéré obtenu à partir de la culture des bactéries dans le Silantes OD2 CDN.

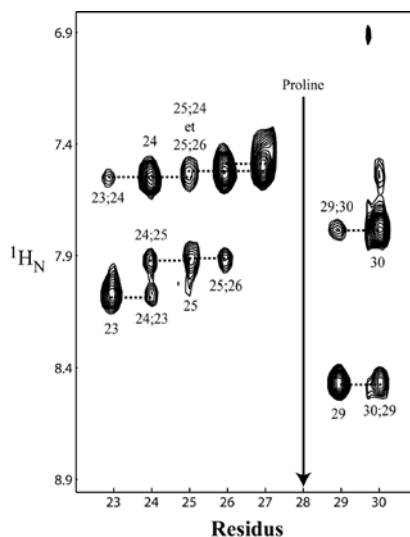


Figure III.6 : Bandes de spectre 3D ^1H - ^{15}N -HSQC-NOESY-HSQC extraites des couples (^1H , ^{15}N) et alignées selon la séquence de la protéine. Ce type de représentation permet de confirmer l'attribution par l'observation des NOEs i, i-1 et i+1 entre les protons amides. La proline n'est pas observable du fait de l'absence de proton amide dans ce résidu.

Grâce à ces expériences, 271 NOEs sur l'expérience éditée ^1H et 196 NOEs sur l'expérience éditée ^{15}N ont été identifiés. Toutes ces informations ont permis de déduire la topologie de la protéine. Des contacts entre les résidus T68/E80, T68/T82 et H70/V78 indiquent que les brins $\beta 1$ et $\beta 2$ forment un feuillet β antiparallèle de même que les brins $\beta 3$ et $\beta 4$ avec les contacts L90/I99 et C92/K97. Les 3 NOEs R120/C132, N123/Y129 et S125/Y127 ne concernent que des résidus appartenant au feuillet $\beta 5$ et ne sont possibles que si $\beta 5$ forme un long feuillet antiparallèle avec le brin $\beta 5'$ de l'autre sous-unité du dimère.

Ces expériences ont également permis de vérifier la localisation des hélices α faites par la méthode des CSI avec l'observation des NOEs entre protons amides entre un résidu (i) et les résidus (i+1), (i+2) voire (i+3). D'autres NOEs ont permis de déduire l'association des brins β entre-eux.

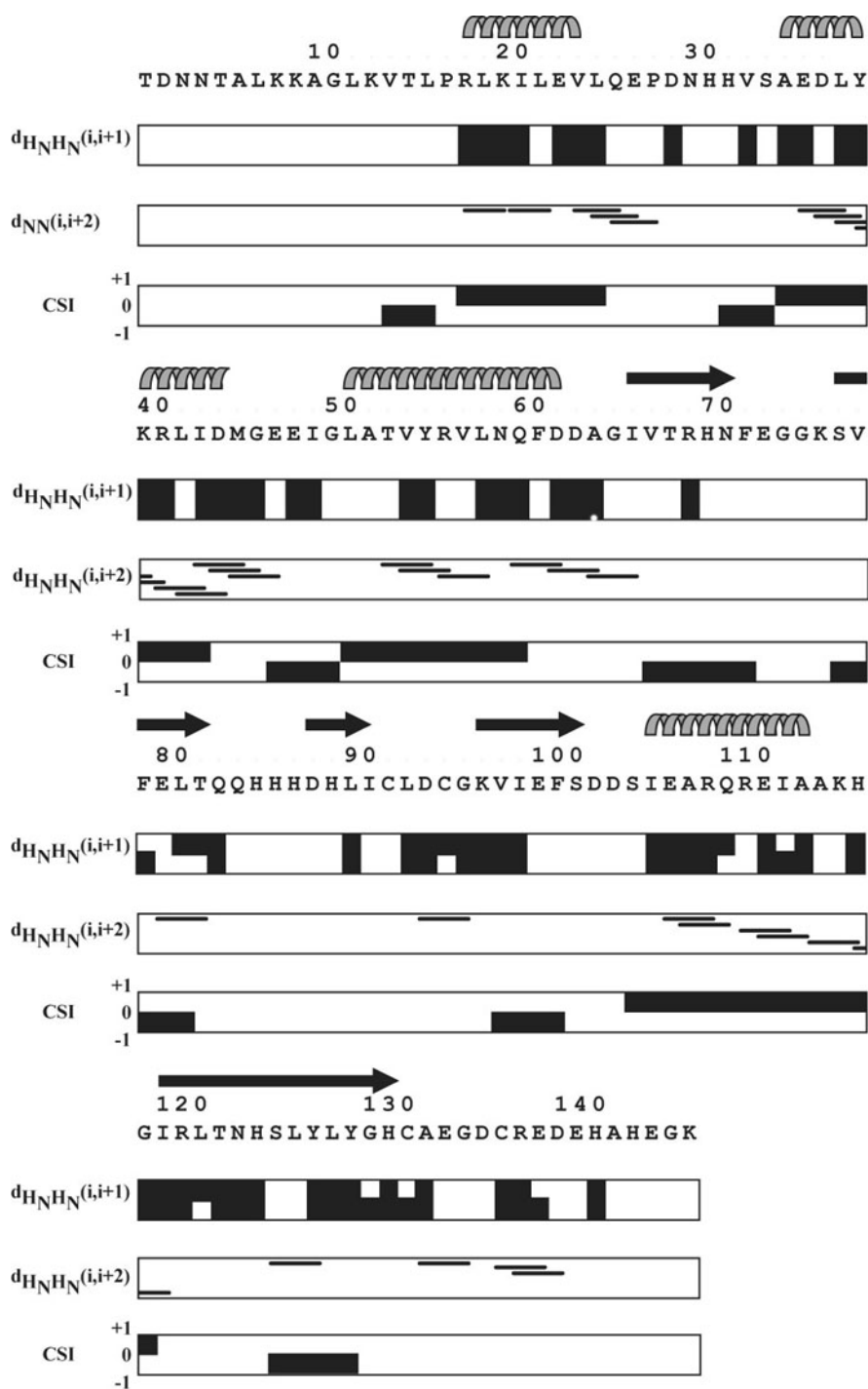


Figure III.7 : Récapitulatif des informations obtenues par RMN sur Zn_5FUR_D d'*E.coli*. Les $d_{H_NH_N}$ correspondent aux NOEs observés entre protons amide. Le CSI correspond au consensus de l'index des déplacements chimiques secondaires (δ) des CO et $C\alpha$ obtenu à partir du programme écrit par Wishart et *al.* Une valeur de 1 indique la présence d'une hélice et une valeur de -1 révèle la présence d'un feuillet.

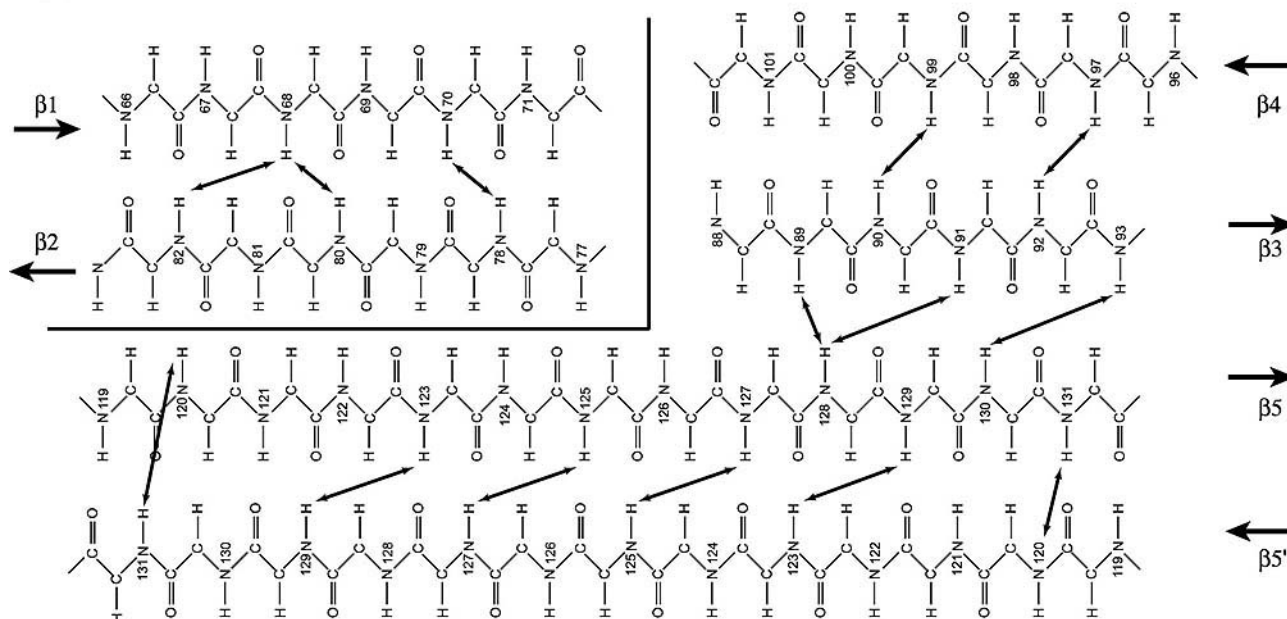


Figure III.8 : Association des brins β du dimère de apo FUR déduite à partir de l'étude des NOEs entre groupements amides. Les brins $\beta 5$ et $\beta 5'$ forment un feuillet β antiparallèle inter sous-unité. Les chaînes latérales ont été omises par souci de clarté.

L'identification des liaisons hydrogènes par RMN peut également fournir de l'information sur la proximité spatiale entre différentes parties de la protéine et permet d'obtenir de l'information supplémentaire sur la topologie (3).

Une expérience TROSY permettant d'observer les liaisons hydrogènes dans un échantillon perdeutééré (27) a été enregistrée. Cette expérience corrèle l'azote et le carbonyle ($^3J_{\text{NCO}}$) en utilisant le faible couplage ($^1J_{\text{NCO}} < 1 \text{ Hz}$) entre un azote ^{15}N d'une liaison amide donneur et le ^{13}C du groupe carbonyle accepteur. Malheureusement, la relaxation trop rapide des ^{15}N de la liaison amide de la protéine n'a pas permis d'observer une seule liaison hydrogène. L'explication retenue provient de l'analyse de la séquence d'impulsion. Celle-ci contient des périodes de durée $2T = 133 \text{ ms}$ ($2T = 2/{}^1J_{\text{NCO}}$) permettant de limiter le transfert d'aimantation par couplage scalaire de l'azote amide vers le CO précédent. La relaxation transversale T_2 moyenne de l'azote 15 dans notre échantillon hautement deutéré étant de 75 ms environ, le signal disparaît durant ces périodes $2T$ et n'existe plus avant l'acquisition. Ce temps de relaxation est court comparé aux $\sim 180 \text{ ms}$ observées sur la protéine MAP30 (30 kDa) à 85% deutérée par exemple (27).

Enfin, des expériences permettant d'observer les NOEs entre méthyles ont été enregistrées.

A partir d'un échantillon doublement marqué $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$, une première expérience 3D ^1H - ^{13}C -HSQC_NOESY_HSQC contenant une période de durée constante (permettant de ne plus observer le couplage scalaire $^1J_{^{13}\text{C}-^{13}\text{C}}$) a été enregistrée. Cette expérience permet d'observer des NOEs entre ^1H des méthyles. Peu de NOEs ont été observés et correspondent à des NOE entre méthyles d'un même résidu

(leucines, isoleucines). Bernhard Brutscher a montré que cette expérience n'était pas optimale pour les protéines de grande taille, la relaxation des carbones durant la période de durée constante (28 ms) entraînant une baisse importante de sensibilité. Une expérience similaire avec découplage homonucléaire carbone-carbone a donc été enregistrée. Grâce à cette modification, un gain d'environ **30 à 50 %** du signal a été obtenu ce qui a permis d'augmenter le nombre de signaux observés.

Parmi les 110 pics de corrélation attribués, seuls 5 (soit ~5%) proviennent d'interactions longue distance, les autres provenant d'interactions entre méthyles intra-résidu. Les NOEs I21/I49 et I21/V57 indiquent que les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 4$ sont proches dans l'espace. Les NOE V33/L38 et I49/V54 indiquent que les boucles reliant les hélices $\alpha 2/\alpha 3$ et $\alpha 3/\alpha 4$ sont stabilisées par une ou plusieurs interactions avec des résidus appartenant à des structures secondaires (L38 et V54 dans notre cas).

Les résidus correspondant aux positions 21, 49, 57 chez FUR d'*E.coli* sont hydrophobes dans les différents microorganismes et sont donc probablement importants dans la stabilisation de la structure du domaine N terminal.

Un seul NOE longue distance est observé dans la partie C terminale entre I99 et I119. L'isoleucine 99 appartient au brin $\beta 4$ et l'isoleucine 119 se situe 5 résidus après la fin de l'hélice $\alpha 5$ (d'après les données RMN). Sachant que $\alpha 5$ contient 14 résidus et fait donc environ 20Å de longueur, que $\beta 4$ n'est séparé de $\alpha 5$ que de 2 résidus et surtout que le brin $\beta 3$ se situe entre les brins $\beta 4$ et $\beta 5$ (Figure III.8B), les résidus 99 et 119 d'une même sous-unité ne peuvent pas être assez proches dans l'espace pour donner un signal NOE. Le contact observé correspond donc probablement à une interaction inter sous-unité et suggère que les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 5'$ sont antiparallèles.

Malheureusement, de manière globale, le nombre de contraintes NOEs est bien trop faible pour lancer un calcul de structure. Parmi les NOEs entre groupements amides, seuls 13 proviennent d'interaction entre résidus éloignés dans la séquence. Avec les 5 NOEs méthyles-méthyles, nous nous retrouvons donc avec seulement 18 contraintes longues distances.

A ce stade de l'étude, la structure cristallographique de $Zn_RZn_SFUR_D$ de *Pseudomonas aeruginosa* cristallisée en présence de zinc résolue par diffraction des rayons X a été publiée (22). Cette protéine est un dimère avec un Zn(II) dans le site structural et un Zn(II) dans le site régulateur et sera donc dénommée $Zn_RZn_SFUR_D$.

Afin d'augmenter le nombre de contraintes structurales et de vérifier que la structure de Zn_SFUR_D d'*E.coli* est semblable à celle de $Zn_RZn_SFUR_D$ de *P.aeruginosa*, nous avons décidé de mesurer les couplages dipolaires résiduels.

III.4.2 Mesure des couplages dipolaires résiduels dans la chaîne polypeptidique

Le but de cette approche est de pouvoir déterminer l'orientation relative des différents éléments de structures secondaires de Zn_5FUR_D d'*E.coli* et de vérifier si la structure est identique ou non à celle de $Zn_RZn_5FUR_D$ de *P.aeruginosa*. Nous avons décidé de mesurer plusieurs couplages par plan peptidique (N_iH_i , $CO_{i-1}H_i$, $CO_{i-1}C\alpha_{i-1}$) afin d'augmenter le nombre de données. Nous pourrions ainsi déterminer l'orientation de chaque élément de structure de manière indépendante si les jeux de données sont suffisamment complets.

Pour faire cette étude, nous avons choisi le milieu constitué d'un mélange d'alcool $C_{12}E_6$ /hexanol 5% $r=0,64$. Ce milieu présentait divers avantages : son coût faible, sa facilité de préparation, la bonne maîtrise de ce milieu au laboratoire et sa bonne compatibilité avec de fortes concentrations en sels (dans notre cas 500 mM KCl) (25).

Pour mesurer les couplages, nous avons enregistré 3 expériences de type 3D HNCO permettant de mesurer les couplages dipolaires résiduels $^1D_{NH}$, $^2D_{COH}$ et $^1D_{COC\alpha}$ (Figure III.10). Ces couplages ont été mesurés sur un échantillon triplement marqué à ~50% deutéré à 2.2 mM. Dans un premier temps, les expériences isotropes ont été enregistrées avant de placer la protéine dans le milieu cristal liquide. Le couplage quadrupolaire résiduel observé du D_2O est de 25 Hz, valeur en accord avec les descriptions faites par Otting *et al.* (25).

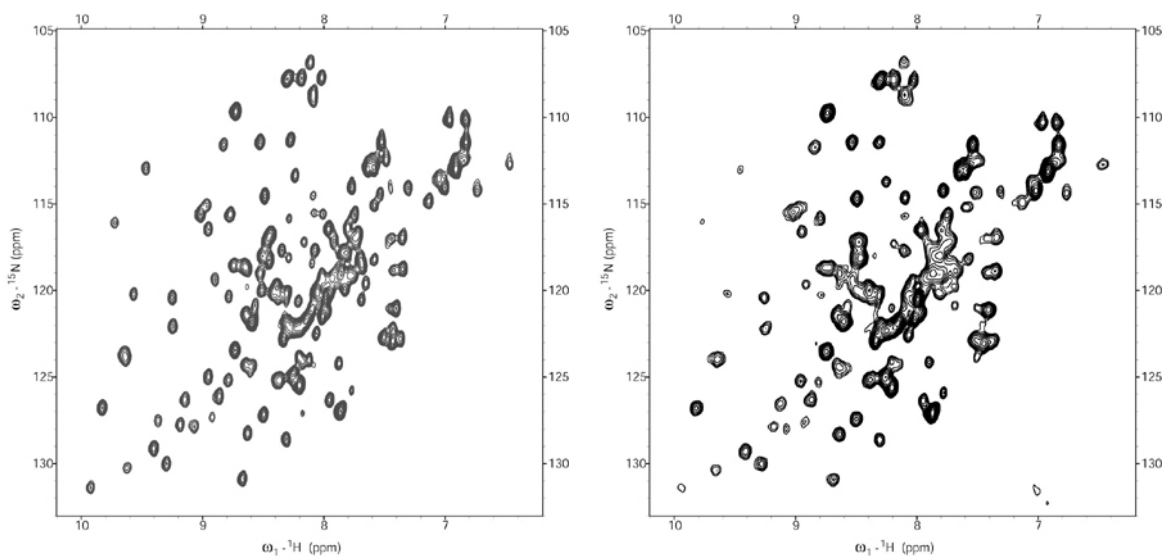


Figure III.9 : HSQC 1H - ^{15}N enregistrée à 600 MHz de l'échantillon deutéré à 50 % en milieu isotrope (spectre de gauche) et anisotrope ($C_{12}E_6$ /hexanol 5 % $r=0,64$; spectre de droite). Tampon MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7.5. On peut remarquer l'augmentation de la largeur de raie dans la dimension 1H qui passe de ~35 Hz en milieu isotrope à ~40 Hz dans le milieu anisotrope. On note également la diminution d'intensité d'un certain nombre de résonances. Les deux expériences ont été enregistrées avec les mêmes paramètres : nombre de scans =8, nombre d'incrément dans la dimension indirecte=128. Echantillons à 2.2mM.

L'ajout du mélange d'alcool entraîne une dégradation de la résolution du spectre avec notamment une augmentation de la largeur de raie dans la dimension ^1H due au couplage dipolaire (Figure III.9). La diminution des intensités des tâches de corrélation n'est pas identique pour toutes les résonances : elle est plus faible pour les résidus des régions flexibles que pour ceux des régions structurées. Seuls les RDCs des résidus flexibles ont pu majoritairement être mesurés, la plupart des résidus structurés ne donnant plus de signaux observables. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène : l'interaction entre la protéine et le milieu est forte et entraîne la perte du signal du fait du long temps de corrélation du complexe protéine/ C_{12}E_6 ou le milieu crée des compartiments où la concentration locale en protéine est plus importante et entraîne l'oligomérisation de FUR.

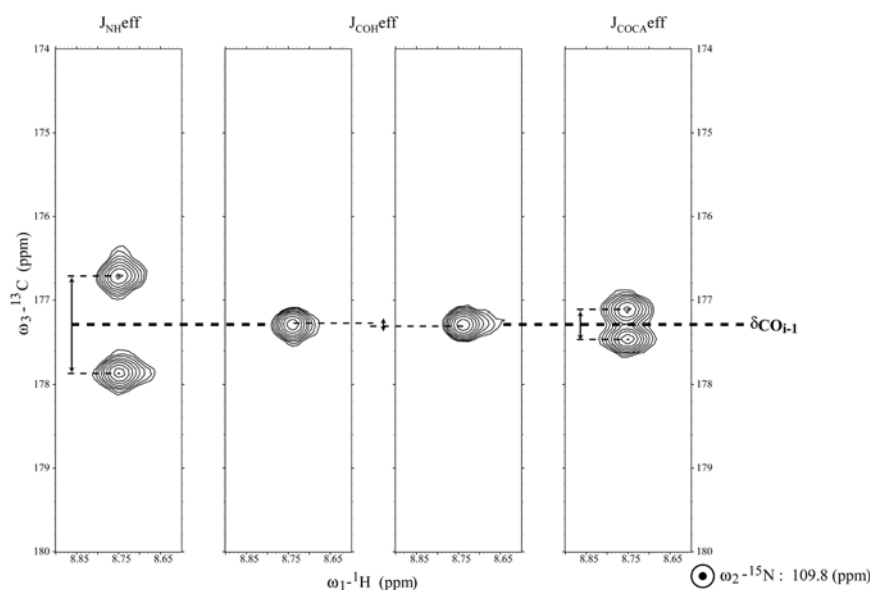


Figure III.10 : Plans ^1H , ^{13}C (résidu G146) des différents spectres 3D utilisés pour la mesure des couplages dipolaires résiduels à partir de l'échantillon triplement marqué et ~50% deutéré dans le milieu C_{12}E_6 /hexanol 5% $r=0,64$.

Les couplages dipolaires mesurés ont alors été analysés à l'aide du programme MODULE v2 écrit au laboratoire (7). Ce programme permet de déterminer le tenseur d'alignement de la molécule en s'aidant d'un modèle qui permet de lever les ambiguïtés d'orientation des vecteurs dues à la dégénérescence du couplage dipolaire. Le modèle utilisé est un modèle de FUR d'*E.coli* basé sur la structure de FUR de *P.aeruginosa*. Il a été réalisé à l'aide du programme Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org>, (14)) à partir de l'alignement des séquences des deux protéines. Tous les couplages mesurés ont été utilisés mais séparés en deux groupes. Un premier groupe contient les couplages mesurés des résidus structurés et le second groupe contient les résidus appartenant aux boucles. La validation du tenseur d'alignement déterminé est réalisée par la comparaison des données expérimentales avec les couplages calculés par le programme (calcul basé sur le tenseur déterminé) et aussi par une simulation Monte-Carlo qui permet d'avoir une idée sur la précision du tenseur d'alignement déterminé.

Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure III.11. L'analyse des couplages des résidus des zones structurées devrait permettre de déterminer le tenseur d'alignement. En effet, pour déterminer le tenseur d'alignement, il faut déterminer les 5 paramètres indépendants de la matrice de Saupe. Théoriquement, 5 couplages suffisent pour le déterminer. L'utilisation de tous les couplages des résidus des zones structurées permet d'utiliser un jeu de 63 données ce qui devrait permettre de déterminer le tenseur d'alignement. Comme on peut le voir sur la Figure III.11, la corrélation entre les données expérimentales et les données calculées est très mauvaise. Ceci peut être dû au manque de précision des mesures ou au fait que le modèle utilisé n'est pas correct ou n'est pas utilisable pour l'ensemble de la protéine.

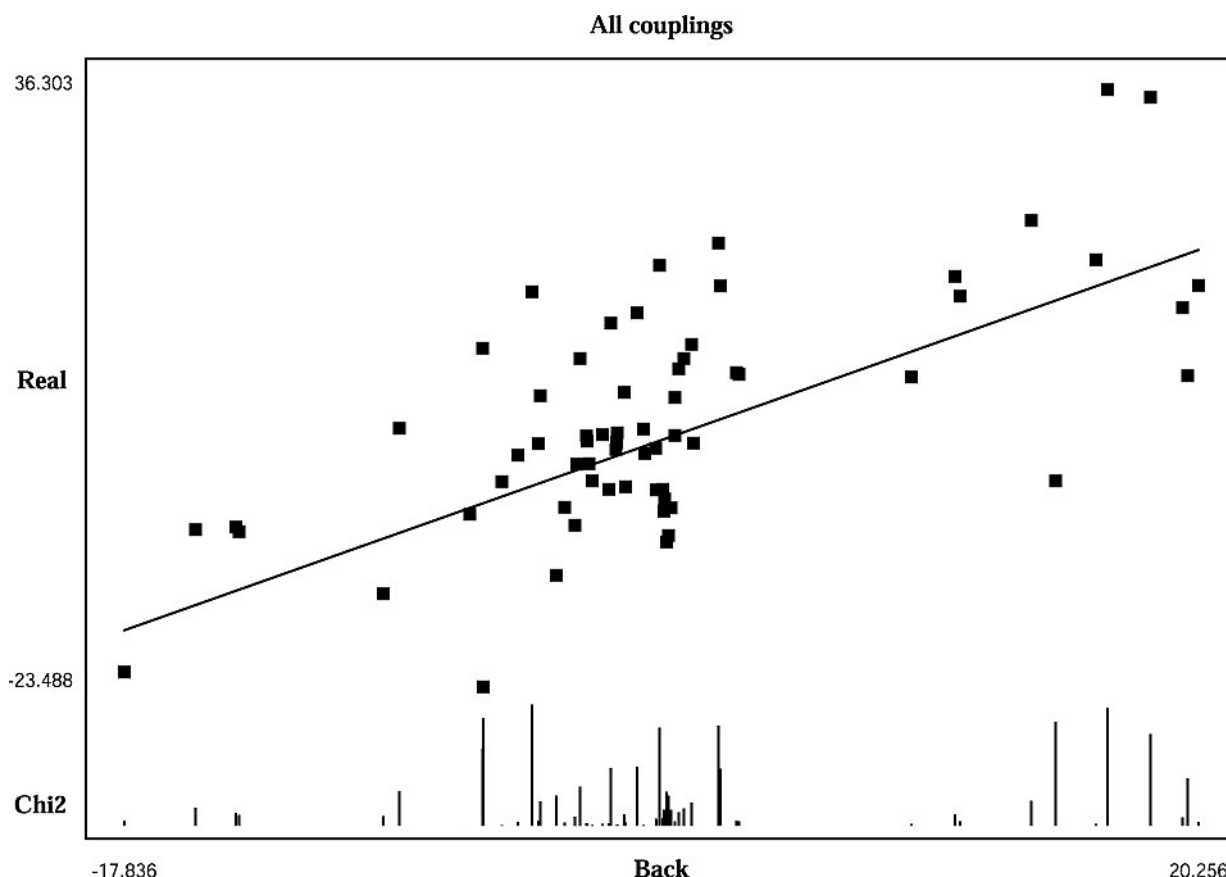


Figure III.11 : Analyse des couplages dipolaires résiduels par le programme MODULE v2 (7). Seuls les résidus des régions structurées ont été pris en compte.

Nous avons ensuite analysé les données en séparant la protéine en deux domaines, le premier correspondant au domaine de liaison à l'ADN (résidus 1 à 84) et le second au domaine de dimérisation. Cette séparation doit théoriquement permettre de voir si la détermination du tenseur d'alignement est possible pour chaque domaine. Si cela est le cas, cela indiquera que l'orientation des deux domaines est différente entre $Zn_S FUR_D$ et $Zn_R Zn_S FUR_D$. Les résultats obtenus n'ont pas été meilleurs (Figure III.12). Ne pouvant utiliser nos données pour estimer le tenseur d'alignement, la conclusion de cette analyse est que les couplages mesurés ne sont pas assez précis. Ceci peut s'expliquer par la faible intensité des résonances des résidus des régions structurées.

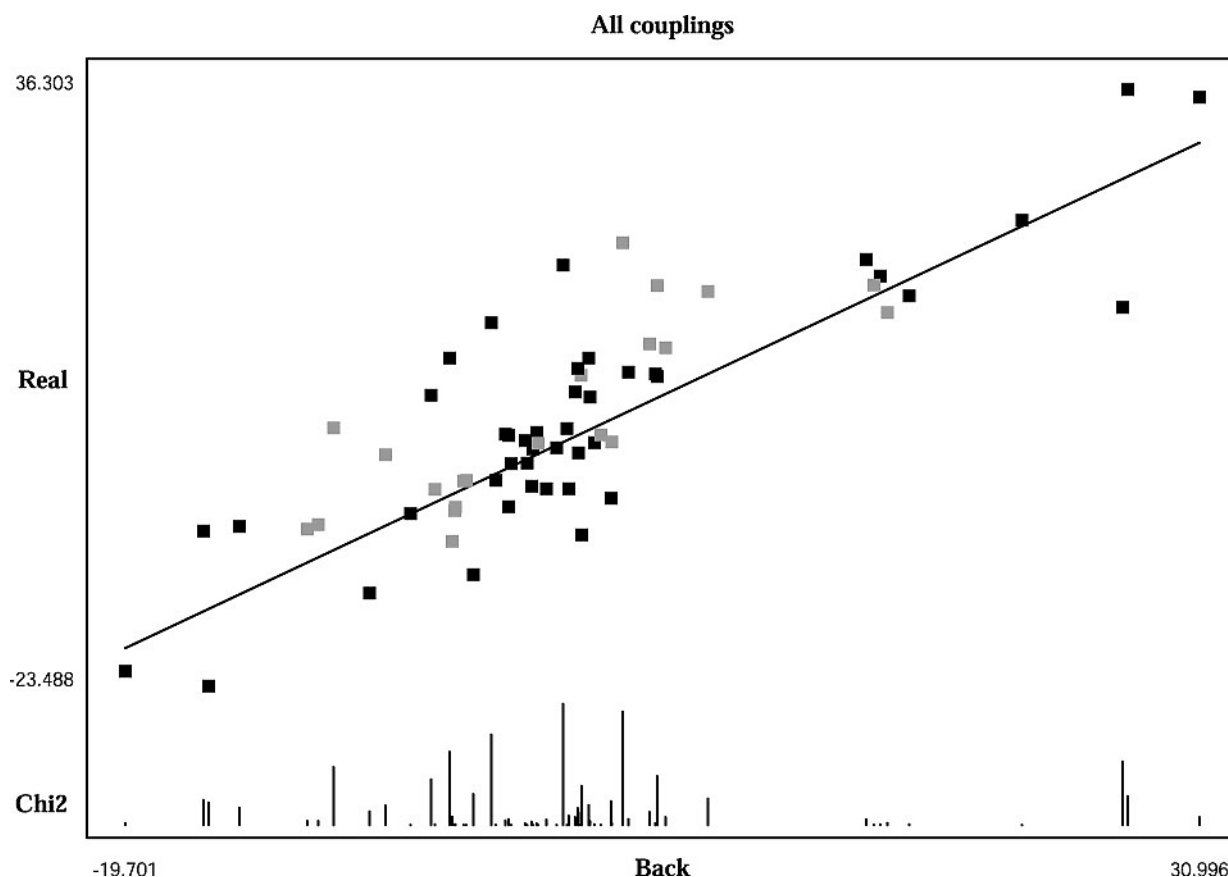


Figure III.12 : Analyse des couplages dipolaires résiduels par le programme MODULE (7). Les résidus des régions structurées du domaine N-terminal et du domaine C-terminal sont respectivement en noir et en gris.

Afin de diminuer les interactions protéine/milieu orienté et/ou protéine/protéine, des tests à partir de mélanges $C_{12}E_6$ /hexanol/CTAB (bromure d'hexadecyltriméthylammonium, détergent) ou de $C_{12}E_5$ /hexanol/CTAB dans des conditions telles que C_nE_m /CTAB (27 :1) ont été réalisés. Les jeux de données ont été obtenus sur des échantillons marqués ^{15}N à partir d'expériences 2D TROSY- 1H - ^{15}N -HSQC. Dans ces expériences, le 1H et le ^{15}N ne sont plus découplés ni pendant la période t_1 ni pendant la détection. La séquence TROSY va permettre de sélectionner soit la composante fine soit la composante large du signal. Le couplage dipolaire correspondra à la différence en fréquence des deux composantes après avoir soustrait le couplage scalaire mesuré en milieu isotrope (Figure III.13). De ce fait, tous les résidus dont les résonances ne sont pas bien résolues ne sont pas pris en compte.

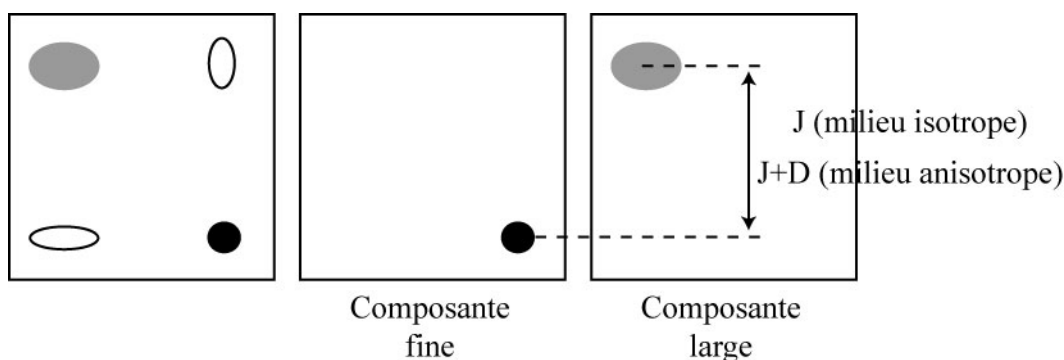


Figure III.13 : Mesure du couplage dipolaire résiduel dans les expériences 2D.

Le CTAB introduit des charges positives. Il forme des micelles qui vont limiter les interactions hydrophobes protéines/ $C_{12}E_6$. L'ajout de CTAB a permis de diminuer la perte de signal par rapport au milieu isotrope de 60% en moyenne (Figure III.14).

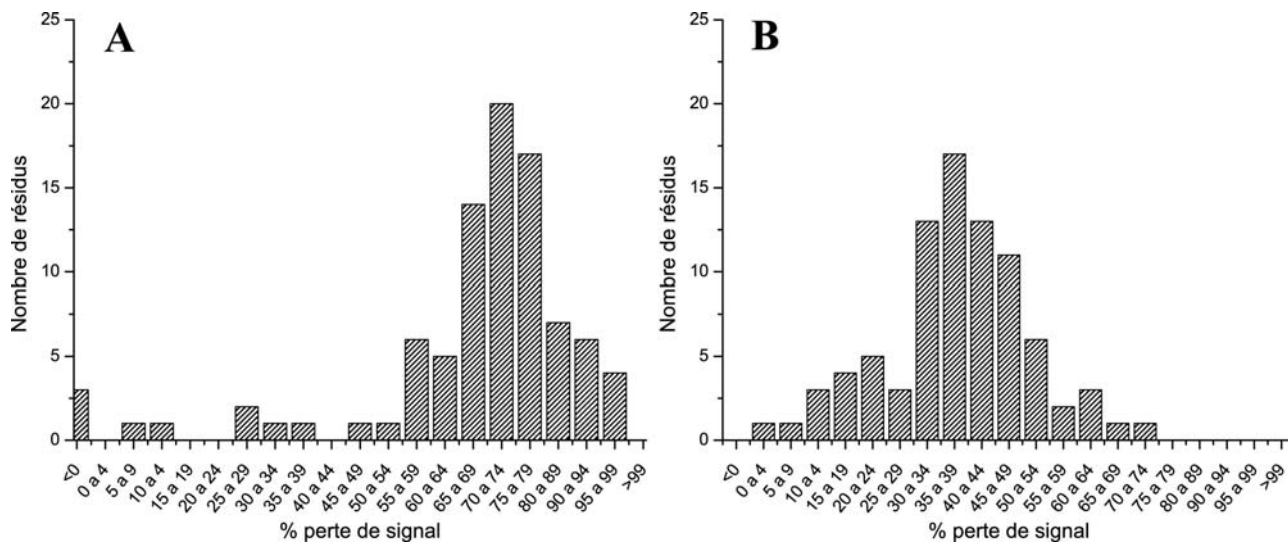


Figure III.14 : Comparaison des pertes de signal en intensité de FUR dans les milieux orientés $C_{12}E_6$ (A) et $C_{12}E_6$ /CTAB (27 :1) (B).

La comparaison des deux jeux de RDCs NH enregistrés dans du $C_{12}E_6$ /hexanol à partir d'échantillons différents (Figure III.15A) montre que de nombreux couplages ne sont pas mesurés avec suffisamment de précision, indiquant ainsi la mauvaise qualité des données. Par contre les mesures sont reproductibles lorsque le couplage est mesuré sur des tâches de corrélation intenses.

L'absence de corrélation entre les données obtenues avec et sans CTAB (Figure III.15B) indique clairement que le détergent change les propriétés d'interaction protéine/ $C_{12}E_6$ et change le tenseur d'alignement de la molécule. On peut également remarquer l'absence de corrélation entre les valeurs mesurées dans les milieux $C_{12}E_6$ /CTAB et $C_{12}E_5$ /CTAB qui traduit que la protéine se comporte encore différemment entre les 2 milieux.

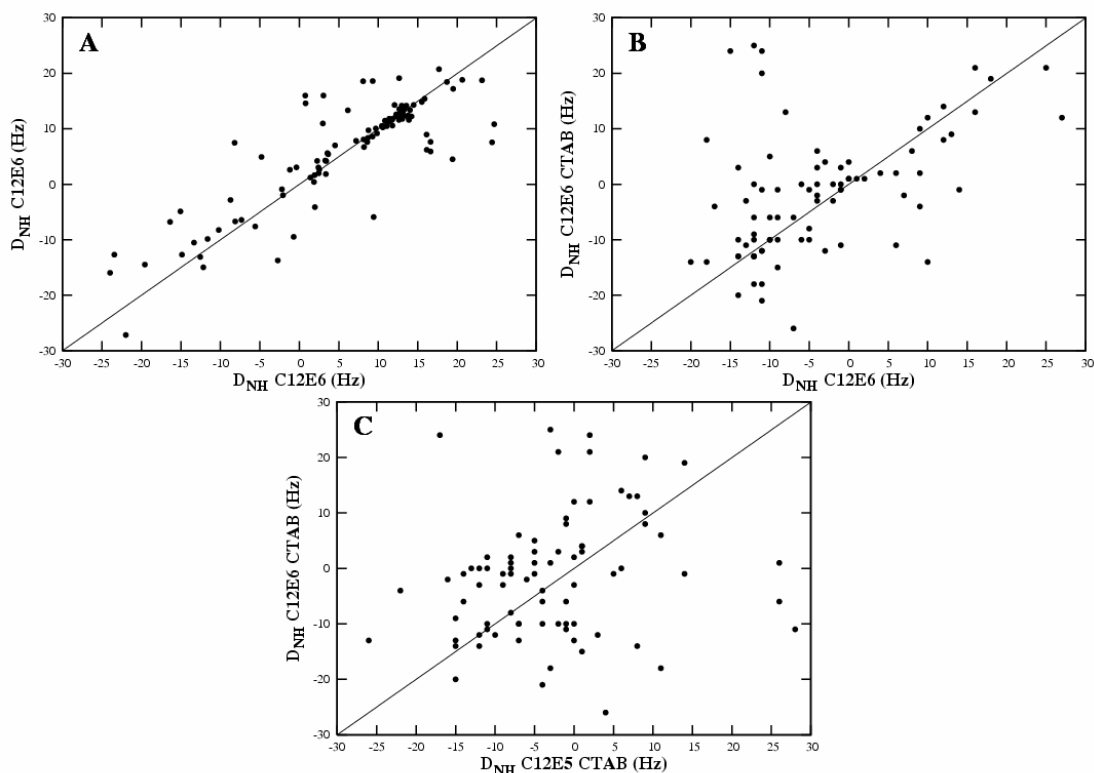


Figure III.15 : Comparaison des couplages dipolaires résiduels mesurés entre ^1H et ^{15}N de la liaison amide dans quelques milieux testés. A) C12E6 / C12E6 ; B) C12E6,CTAB / C12E6 ; C) C12E6,CTAB / C12E5,CTAB. Lors des mesures, seuls les pics bien résolus sont pris en compte.

L'interprétation des données collectées n'a pas permis d'avancer dans la comparaison des structures de $\text{Zn}_R\text{Zn}_S\text{FUR}$ de *P.aeruginosa* et Zn_SFUR d'*E.coli*. En effet, les données sont difficilement interprétables du fait du faible nombre de mesures disponibles. Les tests ne permettent de mesurer que les couplages N-H. Pour déterminer le tenseur d'alignement de la molécule, il faut avoir au moins 5 couplages dipolaires. Si nous utilisons tous les couplages des régions structurées, comme nous l'avons fait sur le premier échantillon, nous obtenons un jeu de données suffisant pour déterminer le tenseur d'alignement. Dans ce cas, la mauvaise corrélation entre les données expérimentales et les données calculées est due à l'imprécision des mesures. Sur les expériences 2D, notre échantillon ne permet pas de mesurer tous les couplages nécessaires pour analyser les éléments de structure secondaire individuellement du fait des recouvrements de résonances.

Afin de voir si il était possible de trouver un milieu permettant de limiter encore plus la perte de signal, d'autres essais avec des phages Pf1 à 12 mg/mL ou des bicelles 5% w/v (DMPC/DHPC = 3 : 1) ont été testés. Ces expériences se sont révélées sans succès à cause de problèmes expérimentaux divers (phages dégradés, lipides dégradés).

A l'issue de ces tests et de tous les résultats obtenus depuis le début de l'étude, le projet visant à obtenir la structure tridimensionnelle de Zn_SFUR_D d'*E.coli* a été arrêté du fait de la difficulté à obtenir des contraintes structurales indispensables à tout calcul de structure.

Néanmoins, les données obtenues par la RMN peuvent être comparées avec les données de cristallographie obtenue sur FUR de *P.aeruginosa*.

III.5 Discussion

III.5.1 Comparaison de la structure cristallographique de FUR de *P.aeruginosa* ($Zn_R Zn_S FUR_D$) avec les données RMN obtenues sur l'apo dimère de FUR d'*E.coli* ($Zn_S FUR_D$)

La très bonne corrélation entre les structures secondaires déterminées par RMN et celles observées dans la structure cristallographique montre que les deux protéines ont des structures secondaires globalement similaires (Figure III.16). Comme FUR de *P.aeruginosa*, FUR d'*E.coli* peut être décomposée en deux domaines, un domaine de liaison à l'ADN comportant environ les 84 premiers résidus et un domaine de dimérisation. Le premier domaine comporte un motif de liaison à l'ADN de type H-T-H ailé constitué des hélices (α_2 , α_3 , α_4 , β_1 et β_2). Le second domaine permet de former l'interface de dimérisation par l'intermédiaire des brins β_5 et β_5' qui forment un feuillet antiparallèle.

La différence majeure entre les deux protéines se situe au niveau de l'hélice α N terminale observée dans la structure cristallographique et absente dans la structure en solution d'après les données RMN. La forme étudiée par RMN de FUR étant l'apo dimère ($Zn_S FUR_D$), l'absence de cette hélice peut suggérer que lors de l'incorporation du cofacteur, une structuration en hélice des premiers résidus de l'extrémité N terminale se réalise. Selon cette hypothèse, cette hélice jouerait donc un rôle dans l'activité de la protéine. Coy et *al.* (4) indiquent que la perte des 9 premiers résidus de FUR d'*E.coli* entraîne une baisse de la spécificité de la liaison de FUR à l'ADN *in vitro*. Ces résultats vont dans le sens d'une importance de cette région dans l'activité de la protéine. Pohl et *al.* ont proposé que cette hélice pourrait jouer un rôle dans la stabilisation du complexe FUR/ADN, d'après leur modèle d'interaction protéine/ADN, où cette hélice permettrait de former des contacts supplémentaires avec l'ADN mais les auteurs restent très prudents vis-à-vis de leur modèle (22).

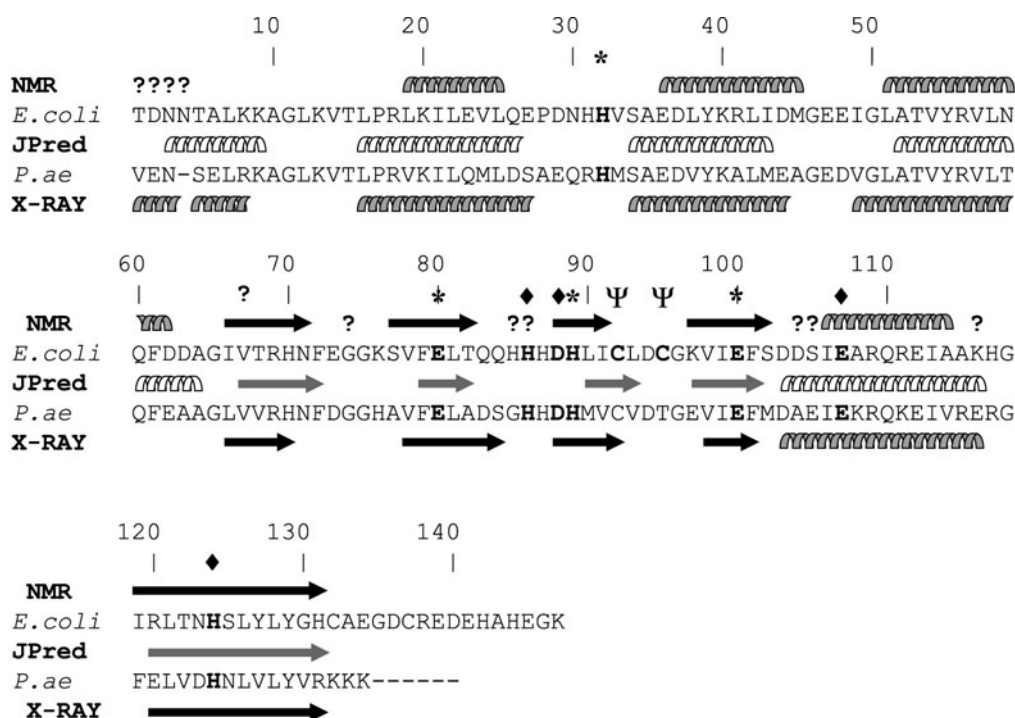


Figure III.16 : Alignement des séquences de FUR d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* avec les structures secondaires identifiées par RMN pour FUR d'*E. coli*, cristallographie pour FUR de *P. aeruginosa* (22) et prédites sur le serveur JPred pour FUR d'*E. coli* (13). Les données RMN et cristallographiques sont très proches excepté pour les premiers résidus de la région N terminale où l'on observe la présence d'une hélice α dans la structure cristallographique absente dans la structure de l'apo dimère de FUR d'*E. coli*. Les résidus en gras sont impliqués dans la coordination des métaux dans les 2 sites métalliques et sont conservés dans les différents organismes. ♦ : résidus impliqués dans le site régulateur chez *P. aeruginosa* ; * : résidus impliqués dans le site structural chez *P. aeruginosa* ; Ψ : résidus impliqués dans le site structural chez *E. coli* (12) ; ? : résidus non attribués.

L'absence de cette hélice $\alpha 1$ dans la forme Zn_5FUR_D d'*E. coli* pourrait s'expliquer par des interactions à l'intérieur du dimère perturbant la formation de cette hélice. En effet, il a été montré par pontage covalent avec l'EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide) et analyse par spectrométrie de masse, que l'extrémité N terminale d'une sous-unité de Zn_5FUR_D est en interaction avec l'extrémité C terminale de l'autre sous-unité (11). L'EDC permet de transformer une interaction ionique entre un carboxylate et une amine primaire en liaison amide. Le pontage identifié se réalise entre l'amine N terminale d'un monomère et un résidu acide non identifié mais situé dans les 10 derniers résidus (REDEHAHEGK). Il est important de remarquer que FUR d'*E. coli* possède 12 acides aminés supplémentaires, par rapport à FUR de *P. aeruginosa*, qui rallongent donc la queue C terminale. Ce phénomène pourrait expliquer le pontage observé et il serait intéressant de voir si ce pontage est réalisable sur la forme non activée de FUR de *P. aeruginosa*.

Si l'on s'intéresse aux NOEs observés sur Zn_5FUR_D d'*E. coli*, on peut voir avec satisfaction que les distances entre les atomes dans la structure cristallographique de $Zn_RZn_5FUR_D$ de *P. aeruginosa* sont compatibles avec l'observations de ces NOEs (Tableau III.4).

	NOEs observés	Structure cristallographique					
		Résidu	Numéro		Résidu	Numéro	Distance mesurée (Å)
NOEs HN-HN	T68/E80	VAL	68.A	<->	GLU	80.A	2.9
	T68/T82	ALA	82.A	<->	VAL	68.A	4.4
	H70/V78	HIS	70.A	<->	VAL	78.A	2.8
	L90/I99	MET	90.A	<->	ILE	99.A	3.0
	C92/K97	CYS	92.A	<->	GLU	97.A	3.7
	R120/C132	GLU	120.A	<->	LYS	132.A	35.7
		GLU	120.A	<->	LYS	132.B	5.0
	N123/Y129	TYR	129.A	<->	ASP	123.A	19.6
		ASP	123.A	<->	TYR	129.B	3.3
	S125/Y127	VAL	127.A	<->	ASN	125.A	6.6
		ASN	125.A	<->	VAL	127.B	2.9
NOEs CH ₃ -CH ₃	I21/I49	VAL	49.A	<->	ILE	21.A	2.7
	I21/V57	ILE	21.A	<->	VAL	57.A	2.4
	V33/L38	MET	33.A	<->	VAL	38.A	2.7
	I49/V54	VAL	49.A	<->	VAL	54.A	2.3
	I99/I119	ILE	99.A	<->	PHE	119.B	2.9
	I99/I119	ILE	99.A	<->	PHE	119.B	32

Tableau III.4 : Tableau donnant les distances mesurées dans la structure cristallographique comparées aux NOEs longues distances observés. Les deux sous-unités du dimère sont désignées A et B.

D'autre part, les données concernant les sites métalliques de FUR d'*E.coli* et de FUR de *P.aeruginosa* suggèrent que, même si les deux protéines ont globalement un repliement similaire, des différences subsistent. En effet, des expériences EXAFS sur FUR d'*E.coli* indiquent que le site structural contient au moins deux soufres comme ligand du Zn(II) (17). D'autres expériences de modification des cystéines à l'iodoacétamide analysées par spectrométrie de masse ont montré que les cystéines 92 et 95 sont impliquées dans la coordination du Zn(II) (12).

Le site structural de FUR de *P.aeruginosa* ne possède pas de cystéines ce qui indique clairement que les deux sites sont différents. Le fait que *P.aeruginosa* FUR ne possède que la cystéine équivalente à la cystéine 92 chez *E.coli* pourrait expliquer cette différence. Si l'on compare les séquences des protéines FUR de différents microorganismes, on s'aperçoit que la majorité des protéines FUR possède deux cystéines séparées par 2 résidus et équivalentes aux positions 92 et 95 d'*E.coli* FUR (Figure III.17). Sachant que le motif CXXC est un motif très favorable à la chélation de métaux (19), le site structural de *P.aeruginosa* FUR ne correspond donc peut être pas au site le plus caractéristique de cette famille. La structure de la zone autour du site structural à Zn(II) est donc différente entre *P.aeruginosa* et *E.coli*.

D'un point de vue mécanistique, les sites métalliques se situent relativement loin de l'hélice d'interaction avec l'ADN ($\alpha 4$) et sont localisés dans le domaine C-terminal de la protéine. Seul le site structural à Zn(II) fait le lien entre le domaine C-terminal et le domaine N-terminal par l'intermédiaire de l'His 32. Dans ce cas, le mécanisme d'activation est loin d'être évident. Une des hypothèses possible serait

que l'activation soit due à un changement conformationnel suite à l'incorporation de métal dans le site régulateur et transmis au domaine de liaison à l'ADN via le site structural à Zn(II). En effet, le brin $\beta 3$ possède notamment deux résidus dont l'un appartient au site régulateur et l'autre au site structural. De ce fait, l'activation serait un effet à distance relayé par le site structural. Une activation de ce type est tout à fait possible puisqu'un mécanisme à distance transmis par un réseau de liaison hydrogène a été observé pour SmtB où le métal est également loin du domaine de liaison à l'ADN (8).

L'incorporation du métal dans le site régulateur va donc permettre le bon positionnement des domaines de liaison à l'ADN l'un par rapport à l'autre pour optimiser l'interaction avec l'ADN. Le type de mouvement impliqué est encore inconnu. En effet, plusieurs mécanismes ont été décrits dans le chapitre I. Nous avons vu que pour la famille SmtB/ArsR, l'incorporation de métal entraîne des mouvements de types quaternaires avec une réorientation (translation/rotation de corps rigide) d'une sous-unité par rapport à l'autre (8). Dans le cas de la famille MerR, le mécanisme observé passe par une réorientation du domaine de liaison à l'ADN à l'aide d'une charnière par rapport au domaine de dimérisation, la charnière se situant entre les deux domaines (20). L'activation des régulateurs de la famille de DtxR passe également par une réorientation du domaine de liaison à l'ADN par rapport au domaine de dimérisation (23), mais aussi par la liaison directe du métal à un acide aminé d'une hélice qui avant métallation gêne stériquement l'interaction avec l'ADN (cf chapitre I).

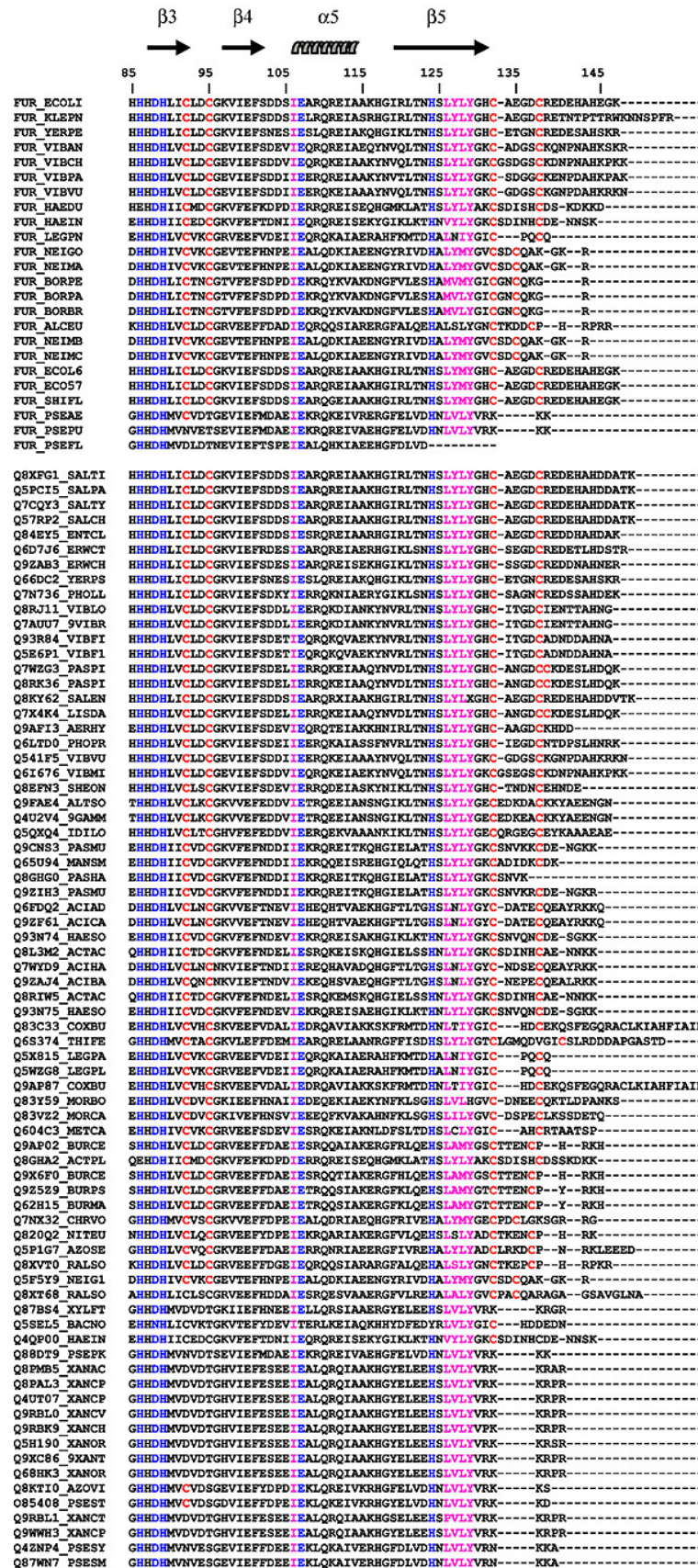


Figure III.17 : Alignement partiel (programmes BLAST puis CLUSTALW) des séquences de FUR de différents microorganismes. La numérotation correspond à celle de FUR d'*E. coli*. Les résidus en magenta sont impliqués dans la stabilisation du dimère par interaction hydrophobe. Les cystéines C terminales (92/95 et 132/137 chez *E. coli*) sont en rouge. Les résidus en bleu sont impliqués dans la coordination des métaux chez FUR de *P. aeruginosa*.

III.5.2 Comparaison avec d'autres protéines appartenant à des familles de métallobrégulateurs

La comparaison de la structure cristallographique avec les données RMN montre que FUR de *P.aeruginosa* et *E.coli* ont des structures secondaires identiques et ont un repliement vraisemblablement très proche du fait de l'importante homologie de séquence (51% d'identité). On retrouve un motif de liaison à l'ADN de type hélice-coude-hélice ailé (W-H-T-H) avec l'hélice α_4 permettant la reconnaissance de l'ADN. Le motif H-T-H (α_1 , α_2 , α_3 , α_4) observé chez *P.aeruginosa* FUR est particulier du fait de la présence de l'hélice N terminale (α_1) observée dans la structure cristallographique de la forme ayant incorporé du Zn(II) dans le site régulateur (Zn_RZn_SFUR_D). Généralement, ces motifs sont composés de 3 hélices dont la dernière permet de stabiliser l'interaction du motif avec l'ADN (16) (Figure III.18). L'hélice α_1 est une différence importante avec *E.coli* FUR puisqu'elle n'est pas présente d'après les données RMN dans la forme apo (Zn_SFUR_D) de la protéine. Nous ne savons pas si la différence observée sur cette hélice α_1 résulte du fait que les protéines proviennent d'organismes différents ou du fait que les formes étudiées sont les formes activées (*P.aeruginosa*) et non activées (*E.coli*) de la protéine.

Certaines protéines possèdent effectivement une quatrième hélice dans le domaine de liaison à l'ADN dont plusieurs membres de la famille SmtB/ArsR (SmtB, CzcA) (2, 8) et plusieurs membres de la famille MerR (CueR, BmrR, Mta) (1, 15, 20). Pour SmtB, cette quatrième hélice correspond à α_1 (en vert sur Figure III.18F) ; elle joue un rôle important dans l'interaction protéine-protéine au sein du dimère. Ce rôle pourrait être semblable pour FUR mais pour des contacts inter- dimère, la polymérisation de FUR sur l'ADN étant un phénomène connu (9, 18). Dans CueR, cette quatrième hélice est α_4 (en rose clair Figure III.18E). Elle appartient à la deuxième aile « W2 » qui permet de renforcer l'interaction avec l'ADN. « W2 » est en fait un second motif H-T-H, que l'on peut trouver parmi les membres de la famille MerR (BmrR, Mta, CueR). Néanmoins, je n'ai pas trouvé décrit dans la littérature de mode d'interaction avec l'ADN utilisant un motif H-T-H ailé dont l'interaction avec l'ADN serait renforcée par une quatrième hélice.

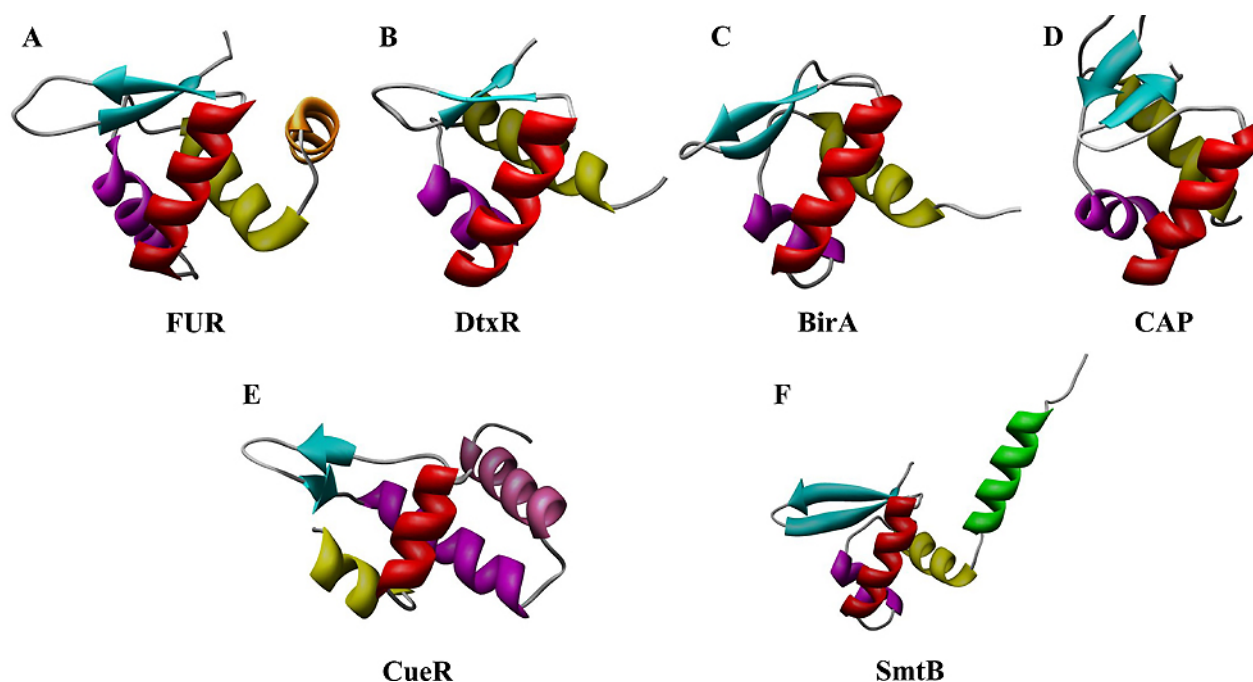


Figure III.18 : Quelques motifs de type hélice-coude-hélice ailé. A : FUR *P.aeruginosa* ; B : DtxR *C.diphtheriae* ; C : BirA *E.coli* et D : CAP *E.coli*. E : CueR *E.coli* et F : SmtB *Synechococcus PCC7942*. L'hélice en rouge correspond à l'hélice d'interaction avec l'ADN. Les motifs hélice-coude-hélice ailés sont formés de 2 hélices α , d'un feuillet β et d'une troisième hélice α qui stabilise l'interaction du motif H-T-H avec l'ADN (16). Tous ces motifs se distinguent par l'orientation relative et la position des hélices les unes par rapport aux autres. Le code couleur sert à visualiser les éléments de structures secondaires qui ont une position « équivalente » dans l'espace dans les différentes protéines (or, magenta, rouge, cyan). La dernière hélice est en orange ($\alpha 1$ FUR), rose (CueR) et verte (SmtB).

Lors de sa purification, FUR d'*E.coli* peut être récupérée sous une forme dimère (majoritaire) et sous une forme monomère (dont la proportion varie selon les purifications). Durant ce travail, nous avons mené parallèlement l'étude du dimère et du monomère. Les résultats obtenus sont abordés dans le chapitre suivant.

Comme nous allons le voir plus tard, l'hélice $\alpha 1$ est observée dans une autre forme de la protéine ce qui suggère que le repliement en hélice de cette zone est possible et joue peut être un rôle dans l'activation de FUR.

Références bibliographiques

1. Changela A, Chen K, Xue Y, Holschen J, Outten CE, et al. 2003. Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science* 301: 1383
2. Cook WJ, Kar SR, Taylor KB, Hall LM. 1998. Crystal structure of the cyanobacterial metallothionein repressor SmtB: a model for metalloregulatory proteins. *J Mol Biol* 275: 337
3. Cordier F, Grzesiek S. 1999. Direct Observation of Hydrogen Bonds in Proteins by Interresidue $^3\text{HJNC}'$ Scalar Couplings. *J Am Chem Soc* 121: 1601
4. Coy M, Neilands JB. 1991. Structural dynamics and functional domains of the fur protein. *Biochemistry* 30: 8201
5. Cuff JA, Clamp M, Siddiqui AS, Finlay M, Barton GJ. 1998. J-Pred: a consensus secondary structure prediction server. *Bioinformatics* 14: 892
6. D'Autréaux B. 2002. *Etudes spectroscopiques de la protéine FUR (Ferric Uptake Regulation). Interaction avec le monoxyde d'azote*. Scientific thesis. UJF, Grenoble
7. Dosset P, Hus JC, Marion D, Blackledge M. 2001. A novel interactive tool for rigid-body modeling of multi-domain macromolecules using residual dipolar couplings. *J Biomol NMR* 20: 223
8. Eicken C, Pennella MA, Chen X, Koshlap KM, VanZile ML, et al. 2003. A metal-ligand-mediated intersubunit allosteric switch in related SmtB/ArsR zinc sensor proteins. *J Mol Biol* 333: 683
9. Frechon D, Le Cam E. 1994. Fur (ferric uptake regulation) protein interaction with target DNA: comparison of gel retardation, footprinting and electron microscopy analyses. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 346
10. Gardner KH, Rosen MK, Kay LE. 1997. Global folds of highly deuterated, methyl-protonated proteins by multidimensional NMR. *Biochemistry* 36: 1389
11. Gonzalez de Peredo A. 2000. *Etude structurale de la protéine FUR (Ferric Uptake Regulation) d'Escherichia coli par spectrométrie de masse*. Scientific thesis. UJF, Grenoble
12. Gonzalez de Peredo A, Saint-Pierre C, Adrait A, Jacquamet L, Latour JM, et al. 1999. Identification of the two zinc-bound cysteines in the ferric uptake regulation protein from Escherichia coli: chemical modification and mass spectrometry analysis. *Biochemistry* 38: 8582
13. Gonzalez de Peredo A, Saint-Pierre C, Latour JM, Michaud-Soret I, Forest E. 2001. Conformational changes of the ferric uptake regulation protein upon metal activation and DNA binding; first evidence of structural homologies with the diphtheria toxin repressor. *J Mol Biol* 310: 83
14. Guex N, Peitsch MC. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18: 2714
15. Heldwein EE, Brennan RG. 2001. Crystal structure of the transcription activator BmrR bound to DNA and a drug. *Nature* 409: 378

16. Huffman JL, Brennan RG. 2002. Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Curr Opin Struct Biol* 12: 98
17. Jacquamet L, Aberdam D, Adrait A, Hazemann JL, Latour JM, Michaud-Soret I. 1998. X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the fur protein from Escherichia coli. *Biochemistry* 37: 2564
18. Le Cam E, Frechon D, Barray M, Fourcade A, Delain E. 1994. Observation of binding and polymerization of Fur repressor onto operator-containing DNA with electron and atomic force microscopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11816
19. Maret W. 2004. Zinc and sulfur: a critical biological partnership. *Biochemistry* 43: 3301
20. Newberry KJ, Brennan RG. 2004. The structural mechanism for transcription activation by MerR family member multidrug transporter activation, N terminus. *J Biol Chem* 279: 20356
21. Nietlispach D, Clowes RT, Broadhurst RW, Ito Y, Keeler J, et al. 1996. An Approach to the Structure Determination of Larger Proteins Using Triple Resonance NMR Experiments in Conjunction with Random Fractional Deuteration. *J Am Chem Soc* 118: 407
22. Pohl E, Haller JC, Mijovilovich A, Meyer-Klaucke W, Garman E, Vasil ML. 2003. Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* 47: 903
23. Pohl E, Holmes RK, Hol WG. 1998. Motion of the DNA-binding domain with respect to the core of the diphtheria toxin repressor (DtxR) revealed in the crystal structures of apo- and holo-DtxR. *J Biol Chem* 273: 22420
24. Rosen MK, Gardner KH, Willis RC, Parris WE, Pawson T, Kay LE. 1996. Selective methyl group protonation of perdeuterated proteins. *J Mol Biol* 263: 627
25. Rückert M, Otting G. 2000. Alignment of Biological Macromolecules in Novel Nonionic Liquid Crystalline Media for NMR Experiments. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 7793
26. Tsai CJ, Nussinov R. 2005. The implications of higher (or lower) success in secondary structure prediction of chain fragments. *Protein Sci* 14: 1943
27. Wang YX, Jacob J, Cordier F, Wingfield P, Stahl SJ, et al. 1999. Measurement of 3hJNC' connectivities across hydrogen bonds in a 30 kDa protein. *J Biomol NMR* 14: 181
28. Wee S, Neilands JB, Bittner ML, Hemming BC, Haymore BL, Seetharam R. 1988. Expression, isolation and properties of Fur (ferric uptake regulation) protein of Escherichia coli K 12. *Biol Met* 1: 62
29. Wishart DS, Sykes BD. 1994. The ¹³C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical-shift data. *J Biomol NMR* 4: 171

Chapitre IV

Etude du passage monomère/dimère

Lors de la dernière étape de purification, les chromatogrammes de filtration sur gel montrent l'existence d'une forme de poids moléculaire apparent de 22 kDa compatible avec une forme monomérique de FUR (M=17 kDa).

Les résultats obtenus par Braun *et al.* ont suggéré que la forme active *in vivo* de la protéine FUR est au moins dimérique (3). Ces résultats ont été confirmés par l'étude de la protéine chimérique FUR/répresseur λ CI857 qui comporte la partie N-terminale de FUR et la partie C-terminale du répresseur λ CI857 (impliquée dans la dimérisation du répresseur). Il a ainsi été montré que l'assemblage en dimère est nécessaire pour observer une spécificité de fixation à l'ADN (14). La protéine chimère inverse (domaine N terminal répresseur / partie C terminale de FUR) a montré que la partie C-terminale de FUR est responsable de la dimérisation de la protéine. Jusqu'à la thèse de Benoît D'Autréaux, la forme monomérique de FUR n'avait pas été caractérisée. Le monomère aurait pu être une forme dénaturée ou inactive de la protéine, mais B.d'Autréaux a montré que du dimère pouvait être reformé à partir de monomère en présence de réducteur et de zinc (5), ce qui augmente l'intérêt d'étudier cette forme.

IV.1 Les données biochimiques sur le monomère de FUR

D'après les études menées par B.D'Autréaux, il existe des équilibres d'oligomérisation entre la protéine FUR dimère et les différentes formes oligomériques (tétramère, hexamère et/ou octamère). Par contre, lorsque du monomère concentré (2 mM) est laissé à incuber de 6 à 10 heures à 20°C puis injecté sur une colonne de filtration sur gel (Superdex 75), le chromatogramme reste identique avant et après incubation sans apparition de formes oligomériques quelles qu'elles soient. Dans les mêmes conditions, une solution de protéine initialement dimérique contiendra du dimère, du tétramère, de l'hexamère et très peu de monomère. La forme monomérique purifiée n'est donc pas en équilibre d'oligomérisation avec la forme dimérique.

La caractérisation par spectrométrie de masse electrospray en conditions dénaturantes du monomère permet d'observer deux espèces de poids moléculaires (16791 \pm 3 Da, FUR) et (16660 \pm 3 Da, FUR*) Da (Figure IV.1). Ces deux espèces sont également présentes dans une solution de dimère et sont caractérisées par des poids moléculaires de (16792 \pm 4 Da) et (16660 \pm 4 Da) (11). La différence de masse d'environ 131 Da observée entre les deux formes correspond à l'excision de la méthionine N terminale par la bactérie *E. coli*.

Ces résultats indiquent que la structure primaire du monomère est la même que celle du dimère.

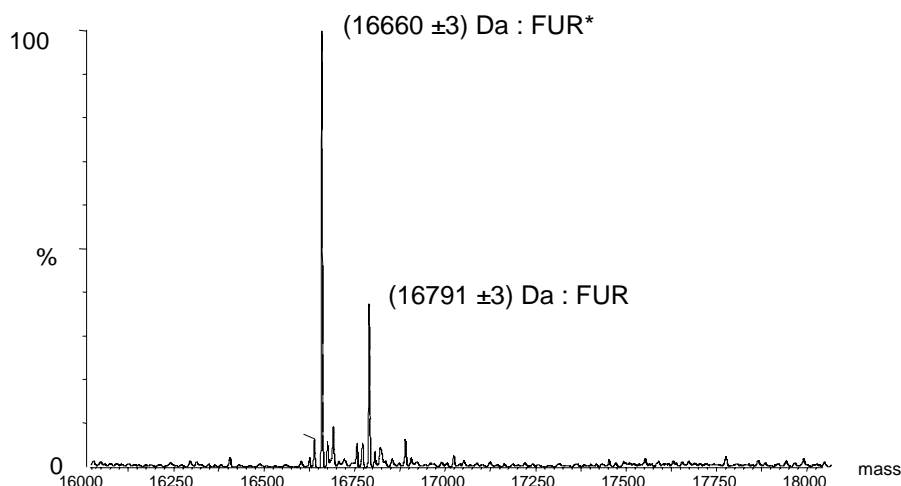


Figure IV.1 : Spectre de masse électrospray en conditions dénaturantes (acétonitrile 80%) du monomère de FUR enregistré sur un spectromètre électrospray-Quadripôle-TOF. La protéine à 50 μ M a été injectée par nanospray. Tension d'ionisation : 1400 V, tension d'orifice : 120 V, température de l'interface : 80°C (issu de (5)).

Comme la structure primaire n'est pas modifiée, un ou plusieurs éléments de structure spatiale doivent être absents dans le monomère. D'après différentes mesures ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), la forme apo dimère contient entre 0,5-0,8 et $0,9 \pm 0,1$ atomes de zinc par sous unité (Zn_5FUR_D) (2, 11). Il a été montré que les Cys 92 et Cys 95 lorsqu'elles sont réduites sont deux ligands du zinc (8, 9). Comme la mutation des ces deux cystéines produit une protéine mutante inactive (4) et que l'oxydation des résidus cystéines diminue l'activité de la protéine de deux ordres de grandeur chez *E.coli* (6), elles jouent vraisemblablement un rôle central dans la fonction de FUR. Comme la forme dimérique n'a pas de pont disulfure intramoléculaire et que toutes les cystéines sont réduites (1), une différence possible avec le monomère pourrait être la présence de ponts disulfures dans la forme monomérique.

La précision de la mesure de spectrométrie de masse précédente n'étant pas suffisante dans notre cas (erreur de 3 Da) pour détecter un pont disulfure intramoléculaire ($\Delta_{masse} = -2$ Da par rapport à 2 cystéines réduites) sur la protéine entière, un traitement à l'iodoacétamide a été réalisé par B. D'Autréaux afin de détecter la présence ou non de ponts disulfures dans la forme monomérique. Le produit de la réaction est analysé par spectrométrie de masse electrospray. Ce réactif réagit avec les cystéines réduites en formant un adduit covalent de masse +57 par cystéine réduite. Aucun adduit n'a été observé dans le monomère. Ceci indique que les thiols ne sont pas réactifs probablement car ils sont oxydés. Ceci est confirmé par l'ajout d'un réducteur comme le DTT sur le monomère. On observe alors des pics correspondant à des masses de 16891 Da et 17022 Da indiquant que les quatre cystéines de FUR monomère réduit ont été alkylées (5). De ce fait, en l'absence de réducteur, les cystéines du monomère sont oxydées. La digestion du monomère par l'endoprotéase LysC puis l'analyse des peptides de digestion par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, Time of Flight) ont permis de localiser les ponts disulfures (Figure IV.2 A et B).

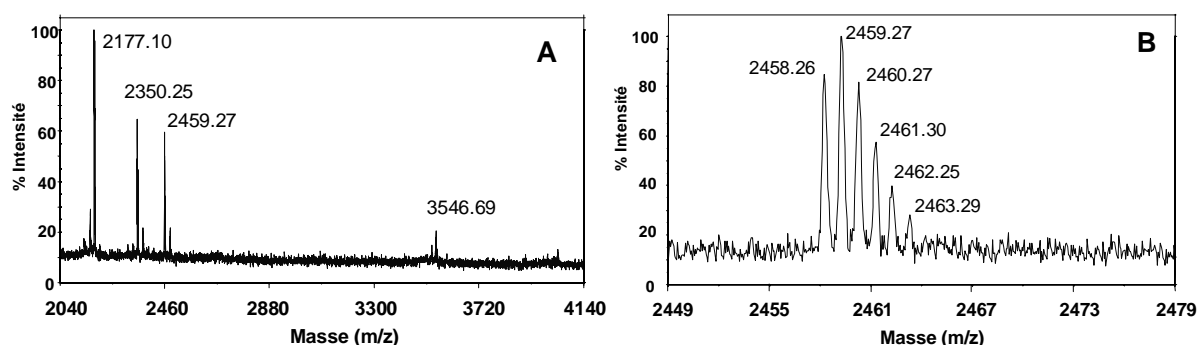


Figure IV.2 : (A) Spectres de masse MALDI du monomère après digestion par la LysC. La protéine, à une concentration de 25 μ M dans un tampon bicarbonate d'ammonium à 100 mM (pH=7,9), a été digérée par la LysC (1% w/w) pendant 6 heures. (B) Agrandissement de la zone m/z 2449 à 2479 (issu de (5)).

L'agrandissement Figure IV.2B montre un massif isotopique dû à la présence des différents isotopes de l'hydrogène, du carbone, de l'azote et de l'oxygène. Le premier pic à (2458,26 \pm 0,05) Da correspond aux isotopes les plus abondants : ^1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , il est appelé pic de masse mono isotopique. La résolution de 1 Da et l'incertitude inférieure à 0,1 Da permettent de caractériser des différences de masse correspondant à un pont disulfure. Les poids moléculaires des fragments peptidiques attendus et effectivement obtenus après digestion par la LysC sont regroupés dans le Tableau IV.1.

Numéro	Fragment	Masse attendue	Masse obtenue
1	98 – 116	2177,12	2177,10
2	21 – 40	2349,17	2349,25
3	77 – 97	2460,16	2458,26
4	117 – 147	3547,6	3545,71
5	41 - 76	4034,06	4034,00

Tableau IV.1 : Masses des peptides issus de la digestion de la protéine FUR monomère par LysC, obtenues par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les masses attendues sont celles correspondant à une protéine FUR non modifiée.

Parmi tous les pics obtenus, seuls les pics correspondant aux peptides 3 et 4 ont une masse inférieure de 2 Da à la masse attendue. Or ces peptides portent respectivement les cystéines C92, C95 (peptide 3) et C132, C137 (peptide 4). Cette différence est compatible avec la présence de deux ponts disulfures intramoléculaires.

En conséquence, le monomère de FUR obtenu après purification correspond à une forme oxydée de la protéine contenant deux ponts disulfures, un premier entre les cystéines 92 et 95 et un deuxième entre les cystéines 132 et 137. Nous l'appellerons donc FUR_{Mox}.

Comme les cystéines 92 et 95 sont engagées dans la coordination de l'ion Zn^{2+} dans le dimère (Zn_5FUR_D), la présence d'un pont disulfure entre ces deux cystéines dans le monomère pose la question de la présence ou non de zinc dans le monomère et le rôle des cystéines et du zinc dans la dimérisation de la protéine.

Une partie de la question a été élucidée par Benoît D'Autréaux. En effet, ce dernier a montré par filtration sur gel que la réduction des cystéines par du DTT n'entraînait pas la dimérisation (Figure IV.3A). L'ajout de zinc sur du monomère oxydé n'entraîne également pas la dimérisation (Figure IV.3B). Par contre, l'ajout de zinc sur du monomère réduit permet d'observer un pic à un volume d'élution correspondant à celui du dimère (Figure IV.3C). Si l'ajout de Zn^{2+} est réalisé 10 minutes après la réduction des cystéines, le rendement de dimérisation est supérieur à celui obtenu si le métal est ajouté 1 heure après la réduction des cystéines (Figure IV.3D). Ce résultat indique que les cystéines réduites ne sont pas stables à l'air et se réoxydent.

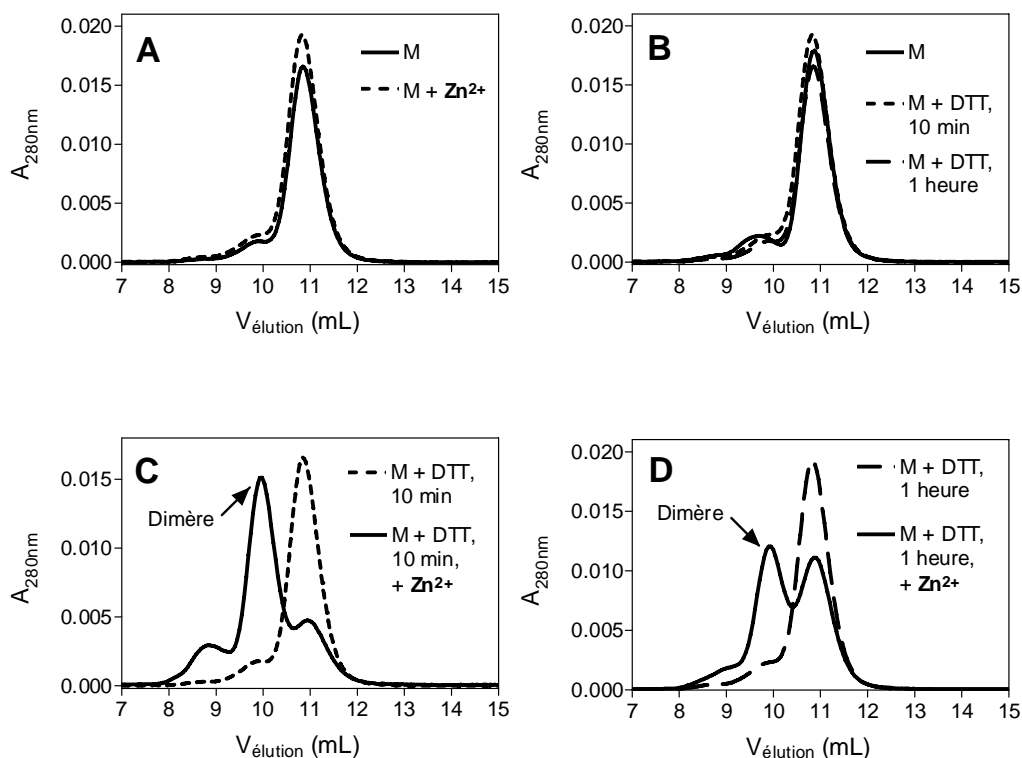


Figure IV.3 : Chromatogrammes de gel filtration du monomère en présence de DTT et de Zn^{2+} . Solution de monomère à une concentration de 1.9 mM dans un tampon Tris/HCl 0,1M, contenant 0,1M de KCl équilibré à pH = 8 puis (A) après l'ajout de 1 équivalent de Zn^{2+} , (B) 10 minutes et 1 heure après l'ajout de 4 équivalents de DTT, (C) 1 équivalent de Zn^{2+} ajouté 10 minutes après 4 équivalents de DTT, (D) 1 équivalent de Zn^{2+} ajouté 1 heure après 4 équivalents de DTT (issue de (5)).

Le passage du monomère au dimère nécessite donc l'ajout successif d'un réducteur puis de Zn (Figure IV.4).

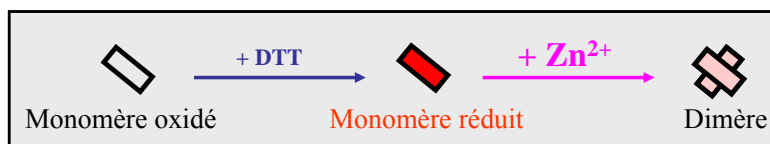


Figure IV.4 : Le passage du monomère au dimère nécessite d'abord la réduction des cystéines puis l'incorporation de zinc.

Afin d'avoir plus d'informations sur les changements intervenant lors de la dimérisation de FUR, nous avons entrepris l'étude structurale du monomère. Il s'agit pour nous de savoir si le dimère formé *in vitro* à partir de monomère est identique au dimère purifié et de voir les changements structuraux intervenant lors de la dimérisation.

IV.2 Etude de la dimérisation par dichroïsme circulaire

Toutes les molécules biologiques sont des chromophores, c'est à dire des molécules qui absorbent la lumière. Dans le cas où ces molécules sont chirales, elles peuvent donner naissance à un phénomène appelé dichroïsme circulaire qui consiste en l'absorption inégale de la composante circulaire droite et gauche de la lumière ($\Delta A = A_G - A_D$). Pour les protéines, l'essentiel du dichroïsme circulaire mesuré résulte de leurs structures secondaires. La contribution de chacun des résidus à l'activité optique s'ajoute dans un arrangement régulier, et tend à se compenser dans des structures irrégulières. Les profils d'absorption d'une hélice α , d'un feuillet β et d'une « pelote statistique » sont donnés en Figure IV.5. La technique du dichroïsme circulaire (CD) permet donc, avec peu de matériel (quelques nanomoles), d'estimer le niveau de structuration de la protéine.

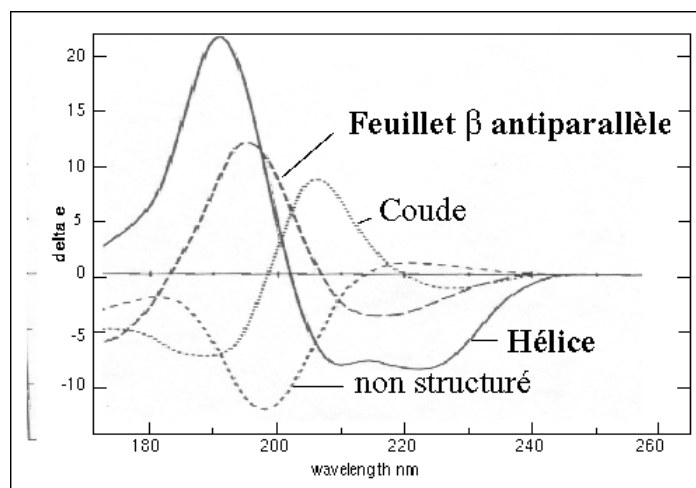


Figure IV.5 : Courbes caractéristiques CD suivant la nature de ces éléments de structure secondaire (issue de *Brahms & Brahms, 1980*).

Nous avons enregistré les spectres de dichroïsme circulaire (CD) dans l'UV lointain (200 – 250 nm) du monomère oxydé, du monomère réduit et du monomère réduit auquel 0,3 à 1,3 équivalents de Zn^{2+} ont été ajoutés (Figure IV.6). Nous avons travaillé dans du tampon MOPS 20 mM KCl 40 mM pH 7 afin d'être dans

des conditions les plus proches possibles des conditions d'anisotropie de fluorescence dont les expériences seront discutées dans le chapitre suivant. La concentration en sel a cependant été diminuée afin de ne pas perturber les spectres.

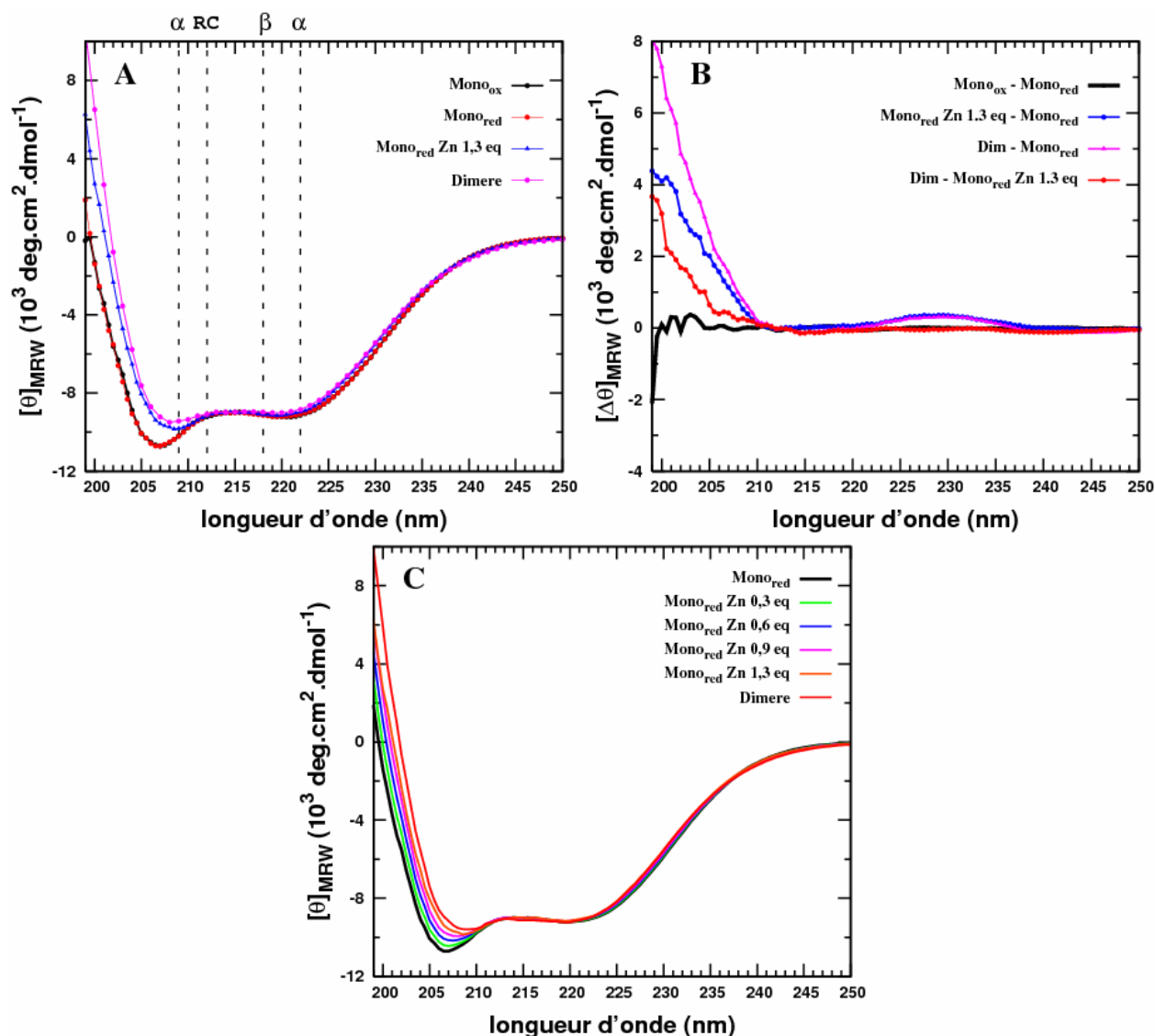


Figure IV.6 : **A)** Spectres de CD enregistrés dans l'UV lointain et normalisés par rapport à la concentration et au nombre de résidus du monomère oxydé, du monomère réduit par 20 équivalent de DTT, du monomère réduit en présence de 1 équivalent de Zn et du dimère. Tous les spectres ont été enregistrés dans du tampon MOPS 20 mM KCl 40 mM pH 7. Le blanc est soustrait de chaque courbe expérimentale. Les longueurs d'ondes caractéristiques des structures secondaires sont indiquées par des traits pointillés avec la structure secondaire correspondante avec « RC » pour « random coil ». **B)** Spectres de différence. Le CD montre que lors de la réduction, les structures secondaires du monomère restent identiques. Par contre, l'ajout de Zn^{2+} entraîne d'importants changements spectraux et l'on « retrouve » le spectre correspondant au dimère. Le spectre du dimère n'est pas totalement retrouvé car le passage monomère dimère n'est pas total du fait de l'excès de DTT qui peut complexer le Zn. Dans notre cas, on peut estimer que 70% du monomère a dimérisé. **C)** Superposition des courbes obtenues au cours des différents ajouts de Zn^{2+} .

Le spectre du dimère possède 2 minima à 209 nm et 222 nm (Figure IV.6A). Celui à 222 nm correspond aux transitions $n \rightarrow \pi^*$ que l'on retrouve dans les hélices α et celui à 209 nm correspond aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$. L'estimation de la composition en structure secondaire est difficile. En effet, les longueurs

d'ondes entre 190 et 200 nm sont très importantes pour les programmes d'ajustements des données or nous ne pouvions obtenir de spectres en dessous de 200 nm à cause de la concentration en sel de notre échantillon.

Le spectre du monomère oxydé montre 2 minima à 206 nm et 222 nm (Figure IV.6A). On peut constater que l'ellipticité molaire par résidu (θ) est faible pour les longueurs d'ondes inférieures à 210 nm. Dans cette région, les résidus non structurés ont l'influence la plus importante sur le signal. La réduction du monomère par du DTT n'entraîne pas de changements visibles (Figure IV.6A et B) sur le spectre ce qui indique que les structures secondaires sont identiques dans le monomère oxydé et le monomère réduit.

L'ellipticité plus faible (en valeur réelle) pour les longueurs d'ondes inférieures à 210 nm dans le spectre du dimère suggère qu'il y a des différences au niveau des structures secondaires entre les formes monomérique oxydée (et réduite) et dimérique. Cette différence spectrale pour les longueurs d'ondes inférieures à 210 nm est très claire sur la Figure IV.6B (courbe magenta, $\Delta\theta = \theta_{\text{dim}} - \theta_{\text{mono ox}}$). Le monomère apparaît donc visiblement moins structuré que le dimère.

L'ajout de Zn^{2+} sur le monomère modifie fortement l'allure du spectre avec une augmentation de l'ellipticité molaire par résidu entre 200 et 209 nm qui s'accompagne également d'un déplacement de la longueur d'onde du minimum d'absorption qui passe de 206 nm à 209 nm (Figure IV.6B et C). Ce déplacement du minimum d'absorption ainsi que l'observation des pics d'absorption à 209 et 222 nm (caractéristiques des hélices α) indiquent que l'incorporation de Zn^{2+} par le monomère réduit s'accompagne d'une structuration notamment en hélices α des régions qui étaient auparavant déstructurées. A 1,3 équivalent de Zn^{2+} par monomère réduit, le spectre obtenu est très proche de celui du dimère. Comme l'ajout de Zn^{2+} sur du monomère réduit entraîne la dimérisation, on peut en conclure que les structures secondaires présentes au sein du dimère natif et du dimère formé *in vitro* sont vraisemblablement similaires ou très proches. Si le spectre du monomère réduit en présence de 1,3 équivalent de Zn^{2+} est déconvolué en fonction des spectres du monomère réduit et du dimère natif, on estime qu'environ 70 % du monomère est passé sous forme dimère. Le fait qu'à 0,9 équivalent la proportion de dimère soit d'environ 50% est probablement dû à l'excès de DTT nécessaire pour réduire toutes les cystéines. En effet, le DTT peut complexer le Zn^{2+} par ses thiols. Nous ne sommes pas allés au-delà d'un excès de 1,3 équivalents de Zn^{2+} car le métal entraîne une précipitation de la protéine. On peut signaler que l'ordre d'ajout du DTT (en premier) puis du Zn^{2+} est important. Si l'ordre est inversé, la dimérisation est plus lente ce qui suggère que le métal est peut être incorporé dans un autre site comme nous le verrons au chapitre V.

Les spectres de différences obtenus du monomère réduit avec 1,3 équivalents de zinc et du dimère natif par rapport au monomère réduit (Figure IV.6B) montrent une différence importante entre 220 et 240 nm avec un $\Delta\theta$ positif. Les modifications spectrales observées dans cette région pourraient être dues aux modifications de l'environnement des chaînes latérales des résidus aromatiques et dans notre cas plus

particulièrement des Tyr (13, 15). En effet, des changements comparables ont été attribués à des modifications d'environnement des aromatiques dans le cas de la chaîne β de l'hémoglobine lors de l'incorporation d'oxygène (10). L'intensité de ces bandes est décrite comme plus intenses dans un environnement hydrophile que dans un environnement hydrophobe. Dans notre cas, ce phénomène pourrait bien être expliqué de façon similaire avec une plus grande hydrophobicité de l'environnement d'acides aminés aromatiques dans la forme monomère. D'après la structure cristallographique de *P.aeruginosa*, l'interface de dimérisation est notamment constituée d'un feuillet β antiparallèle inter sous unité. Au sein de chaque brin $\beta 5$, on retrouve un motif de type « LYL Y » dont les tyrosines pourraient être à l'origine du signal entre 220 et 240 nm. Ce motif n'est pas rigoureusement conservé mais les résidus correspondant sont toujours hydrophobes (cf. chapitre III Figure III.17). Ce motif appartenant au brin $\beta 5$ impliqué dans l'interface de dimérisation d'après la structure du dimère $Zn_R Zn_S FUR_D$ de *P.aeruginosa* (12), il est raisonnable de penser que l'environnement de ces résidus va être modifié du fait de la dimérisation, expliquant ainsi les changements spectraux observés.

Afin de compléter les données obtenues avec le dichroïsme circulaire, nous avons réalisé une analyse semblable par RMN du processus de dimérisation.

IV.3 Etude de la dimérisation par RMN

Les spectres 1H - ^{15}N HSQC du dimère pur et du monomère pur montrent des différences importantes (Figure IV.7A et B). En effet, la gamme des déplacements chimiques est plus petite dans le spectre du monomère que dans le spectre du dimère et la dispersion des résonances est moins importante dans le spectre du monomère. De ce fait on peut conclure que le monomère est moins structuré que le dimère.

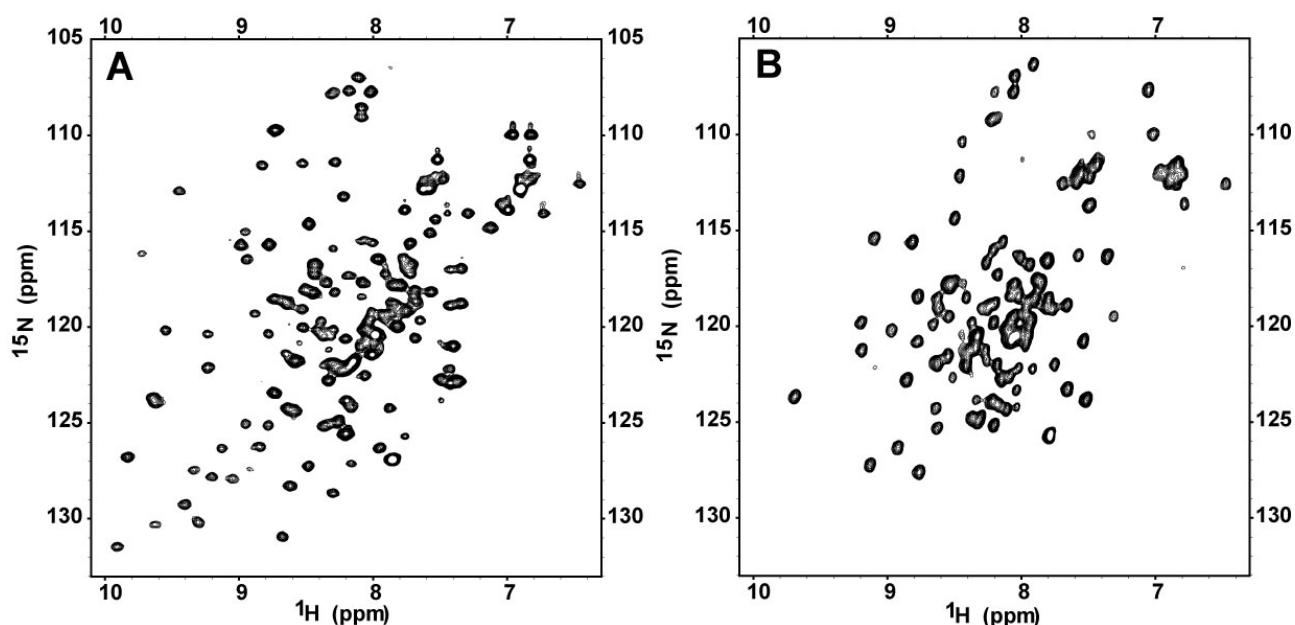


Figure IV.7 : Comparaison des spectres 1H - ^{15}N HSQC du dimère pur à 1,1 mM (A) et du monomère pur à 1 mM (B).

L'enregistrement et l'analyse de spectres RMN ^1H - ^{15}N HSQC du monomère, du monomère réduit et du monomère réduit auquel 0.5, 1 et 1.5 équivalents de Zn^{2+} ont été rajoutés ont permis de confirmer les résultats obtenus par dichroïsme circulaire (Figure IV.8A et B). Les spectres du monomère oxydé et du monomère réduit se superposent bien. Les gammes de déplacements chimiques ^1H et ^{15}N restent les mêmes dans les deux formes ce qui indique qu'il n'y a pas de structuration particulière lors de la réduction du monomère par du DTT. Ces résultats confirment ceux préalablement obtenus par dichroïsme circulaire. Les différences principales observées se situent au niveau des résidus proches des cystéines (Figure IV.8) qui se situent, si l'on se réfère au dimère, près d'un feuillet β pour les cystéines 92 et 95 et dans la queue C terminale pour les cystéines 132 et 137.

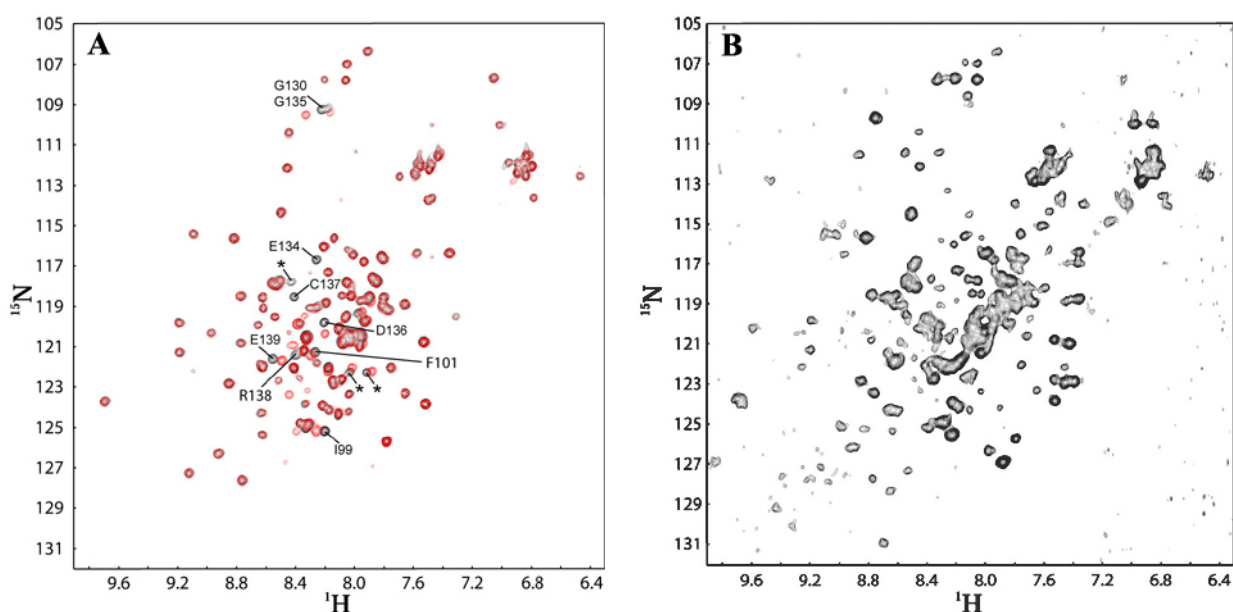


Figure IV.8 : Spectre 2D ^1H - ^{15}N HSQC de FUR monomère 1 mM oxydé (A en noir) et réduit par 20 équivalents de DTT (A en rouge) et du monomère réduit par 20 équivalents de DTT auquel 1,5 équivalents de Zn^{2+} ont été ajoutés (B). La réduction des cystéines n'entraîne pas d'importants changements conformationnels. Des changements sont visibles pour les résidus proches des cystéines. Les résidus indiqués en A) sont issus de l'attribution des résonances du monomère. L'ajout de Zn^{2+} sur le monomère réduit entraîne d'importants changements de structure comme on peut le voir sur le spectre B. On retrouve le spectre du dimère mais la dimérisation n'est pas totale du fait de la présence de DTT en excès qui complexe le Zn^{2+} . L'augmentation de la dispersion des résonances indique une augmentation de la structuration des sous-unités lors de la dimérisation avec notamment la formation de structures en feuillet β .

Par contre, l'ajout d'un excès de Zn^{2+} modifie fortement l'aspect du spectre. On constate un élargissement de la gamme des déplacements chimiques ^1H et ^{15}N qui traduit clairement une structuration de la protéine avec l'incorporation du Zn^{2+} . La RMN confirme donc les résultats apportés par le CD. De nombreux pics apparaissent dans une zone du spectre (entre 8,5 et 9,4 ppm ^1H et entre 127 et 131 ppm ^{15}N) qui comprend usuellement des résidus organisés en brins β . Si l'on compare le spectre obtenu avec les spectres du monomère réduit et du dimère, on retrouve les ensembles de pics de chaque forme. L'échantillon est donc composé d'un mélange de dimère et de monomère ce qui indique que la dimérisation n'est pas

totale. Par contre, l'observation des pics du dimère « natif » permet de conclure que le dimère formé *in vitro* est identique au dimère natif.

La superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC du monomère et du dimère (Figure IV.9) montre que les résidus pour lesquels les changements de déplacement chimique sont les plus importants, sont situés majoritairement dans le domaine C terminal de la protéine.

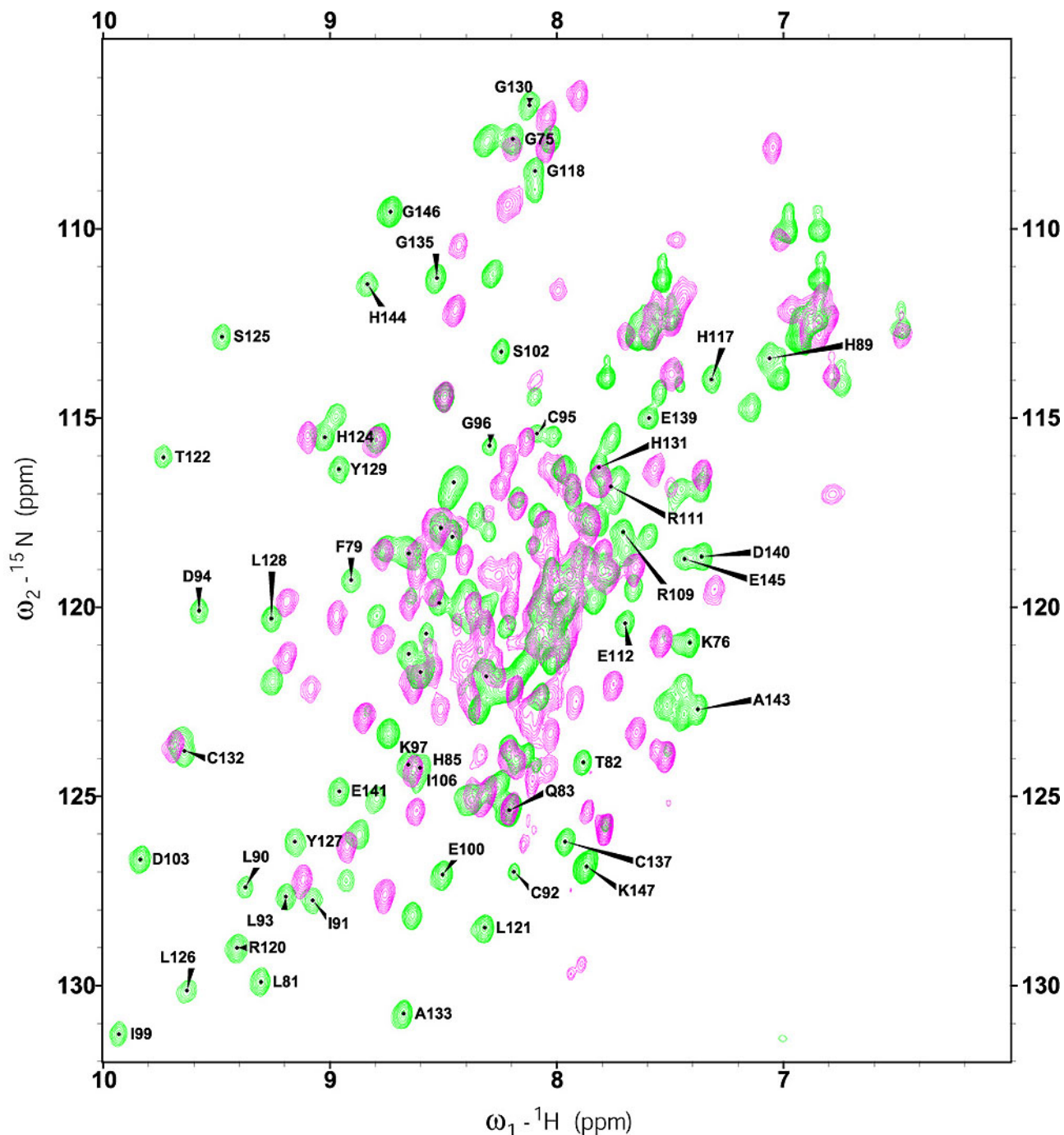


Figure IV.9 : Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC du dimère (en vert) et du monomère (en magenta). Les résonances attribuées correspondent uniquement aux résidus du domaine C terminal du dimère. La structuration intervenant lors de la dimérisation concerne très majoritairement les résidus du domaine C terminal de FUR. L'attribution de la région centrale n'est pas indiquée pour plus de clarté.

En conclusion, les résultats de dichroïsme circulaire et de RMN nous indiquent que les formes monomères oxydées et réduites sont très proches. Les deux techniques indiquent que lors de la réduction, il n'y a pas de changements structuraux importants et la RMN montre que les modifications principales se localisent au niveau des résidus proches des cystéines. L'incorporation de Zn^{2+} par le monomère réduit entraîne une structuration importante de la protéine avec la formation d'hélice α mais également de brins β conduisant à la dimérisation de la protéine. L'analyse des spectres HSQC montre que le dimère formé est identique au dimère natif.

Afin de mieux comprendre les réorganisations structurales intervenant lors de la dimérisation, nous avons réalisé l'attribution des résonances de la chaîne principale du monomère oxydé pour localiser et identifier les structures secondaires.

IV.4 Attribution des résonances du monomère oxydé de FUR de E.coli

La stratégie d'attribution utilisée pour le dimère a été répétée pour le monomère avec un échantillon doublement marqué $^{15}N/^{13}C$ à $\sim 1,7$ mM. Le tampon est globalement le même que celui utilisé pour le dimère. La seule différence réside dans l'ajout d'EDTA à 20 mM. Ce chélatant des métaux permet de stabiliser la protéine en empêchant sa dégradation qui passe notamment par la protéolyse des 9 premiers résidus. Cette protéolyse survient en absence d'EDTA mais est fortement retardée en sa présence. Elle peut être issue d'une autotéolyse métal dépendante soit d'une protéolyse due à la présence de bactéries sécrétant des protéases métal dépendantes.

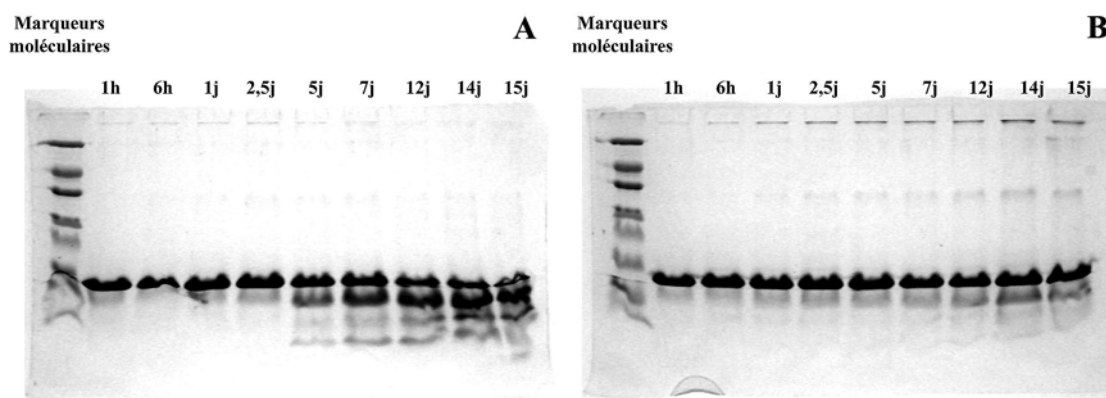


Figure IV.10 : Comparaison de la stabilité à 25°C du monomère de FUR à 1 mM dans MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7 en absence (A) ou en présence (B) d'EDTA 20 mM.

L'attribution du domaine N-terminal du monomère a été réalisée sans difficultés majeures. L'analyse des déplacements chimiques secondaires des CO et C α a permis de déduire la présence de 4 hélices α (résidus 5 à 9, 17 à 24, 35 à 44, et 51 à 63) et de deux brins β (résidus 67 à 71, et 76 à 80) (Figure IV.12). Le domaine C-terminal quant à lui a posé beaucoup plus de problèmes. Seuls 29 résidus sur 67 ont pu être

attribués. Les déplacements chimiques secondaires n'ont pas permis d'identifier clairement de structures secondaires présentes dans ce domaine C terminal. Sachant que 16 pics manquent dans l' ^1H - ^{15}N HSQC, on peut supposer que le domaine C terminal est en échange conformationnel et n'est donc pas bien structuré en absence d'interaction protéine-protéine. Ceci concorde bien avec le fait que ce domaine est impliqué dans la dimérisation de FUR.

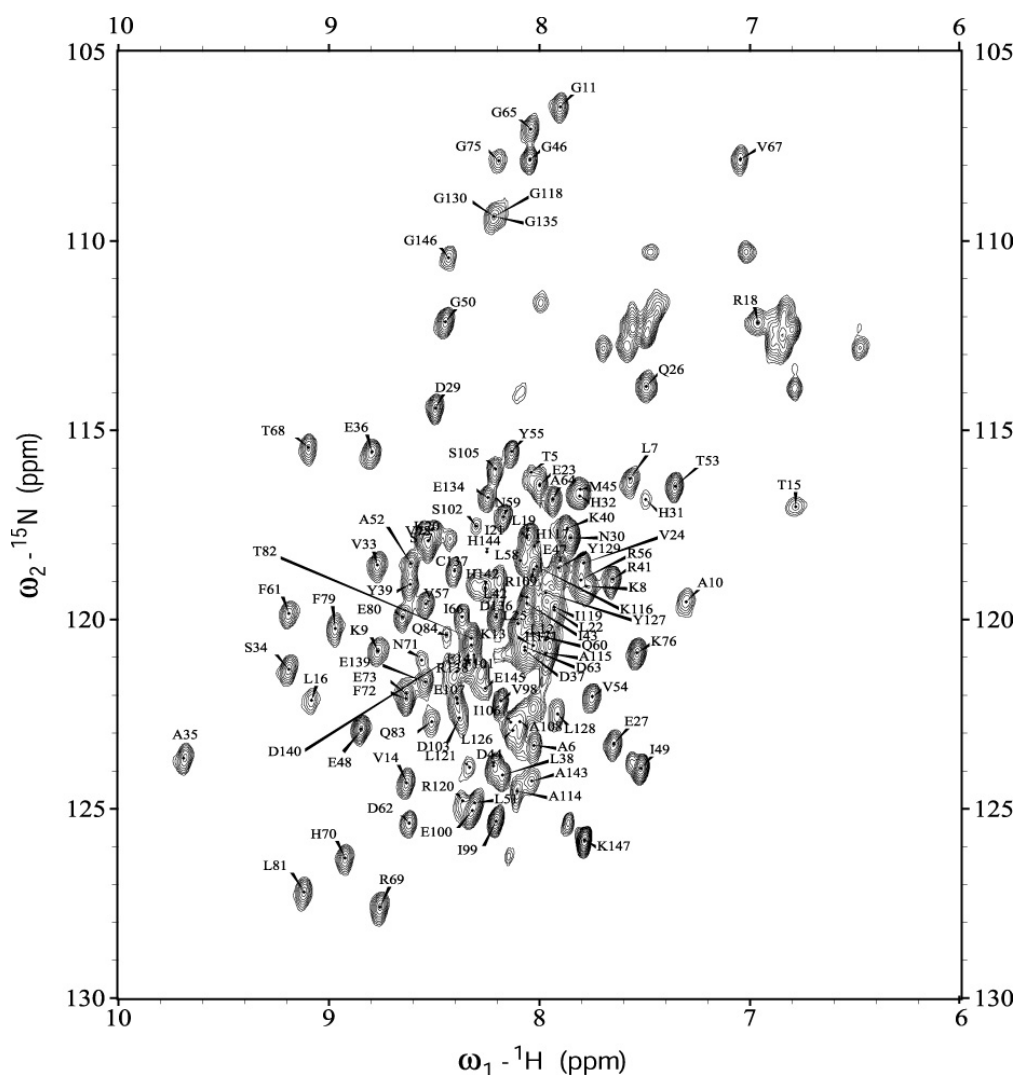


Figure IV.11 : Spectre HSQC ^1H - ^{15}N du monomère avec l'attribution

Les déplacements chimiques secondaires obtenus pour le monomère (Figure IV.12) montrent que le domaine C-terminal du monomère est peu structuré. De ce fait, comme le suggérait la superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC du dimère et du monomère (Figure IV.9), la dimérisation modifie beaucoup la structure du domaine C terminal de FUR. Au niveau du domaine N-terminal, les déplacements chimiques secondaires permettent de déterminer la présence des hélices $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$ et des brins $\beta 1$ et $\beta 2$ (Figure IV.12) identifiés dans le dimère. D'ailleurs, la comparaison des déplacements chimiques secondaires obtenus pour le monomère et le dimère montre que le domaine N terminal est très proche dans les deux formes

(Figure IV.13). Une différence importante se situe au niveau des premiers résidus attribués (5 à 9) qui sont non structurés dans le dimère et forment une hélice α dans le monomère.

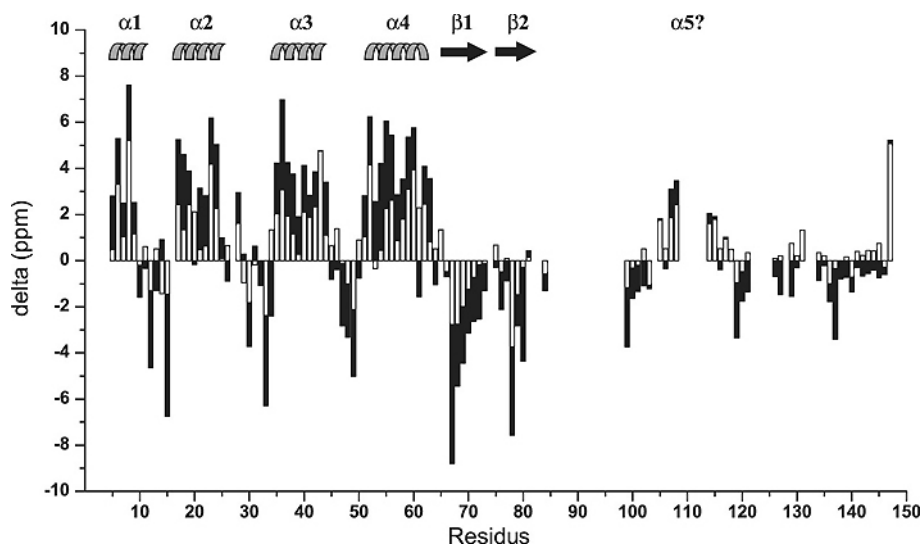


Figure IV.12 : Superposition des valeurs des déplacements chimiques secondaires ($\delta = \delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{random coil}}$) obtenues pour les noyaux CO (barres vides) et Cα (barres pleines) du monomère. Plusieurs résidus successifs ayant un delta positif sont organisés en hélice α et plusieurs résidus successifs ayant un delta négatif sont organisés en brin β .

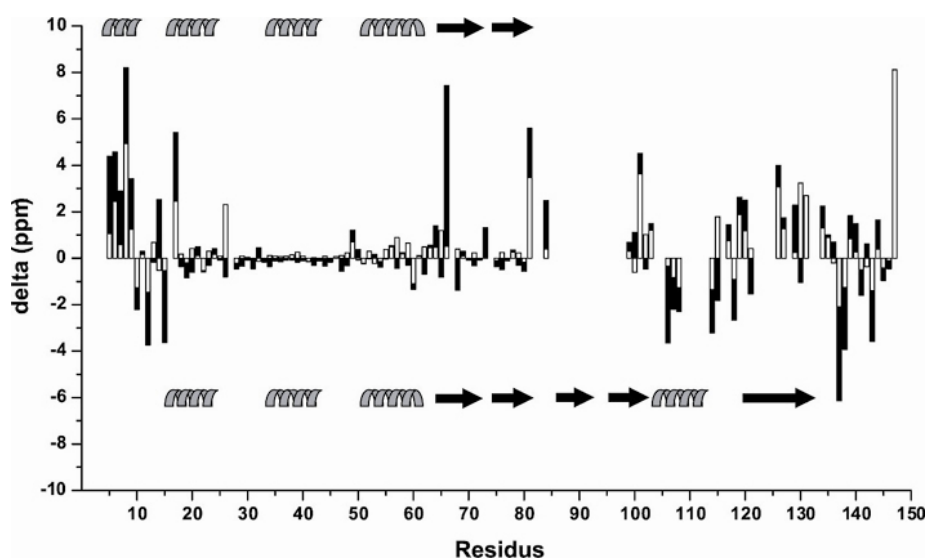


Figure IV.13 : Différences des valeurs des déplacements chimiques secondaires CO (barres vides) et Cα (barres pleines) du monomère et du dimère ($\Delta_{\text{delta}} = \text{delta}_{\text{monomère}} - \text{delta}_{\text{dimère}}$). Les structures secondaires identifiées pour chaque formes sont représentées en haut pour le monomère et en bas pour le dimère. Les structures secondaires du domaine N-terminal sont globalement identiques dans les deux formes. La grande différence réside dans la présence d'une hélice α N-terminale (résidus 5 à 9) présente dans le monomère et absente dans le dimère.

Pour apporter plus de renseignement sur le comportement du domaine C-terminal et aussi pour vérifier notre attribution, nous avons mesuré les NOEs hétéronucléaires à 600 MHz sur le dimère et le monomère. Ces données vont nous permettre d'avoir des informations sur la dynamique du dimère et du

monomère et donc de vérifier l'attribution des zones structurées et non-structurées qui sont caractérisées par des dynamiques différentes.

IV.5 Comparaison des données de relaxation hétéronucléaire ^1H - ^{15}N du dimère et du monomère

La comparaison des NOEs hétéronucléaires à l'équilibre a permis d'obtenir des informations sur la dynamique dans la gamme de temps des nanosecondes des différentes formes de la protéine. Les résidus ayant un NOE hétéronucléaire $> 0,7$ sont considérés comme rigides.

Pour les deux formes, les résidus impliqués dans les hélices α et feuillets β ont un NOE $> 0,7$ et appartiennent donc bien à des régions de la protéine dont la dynamique est restreinte (Figure IV.14A et B) alors que les boucles ont des NOEs inférieurs à 0,7 du fait de leur flexibilité.

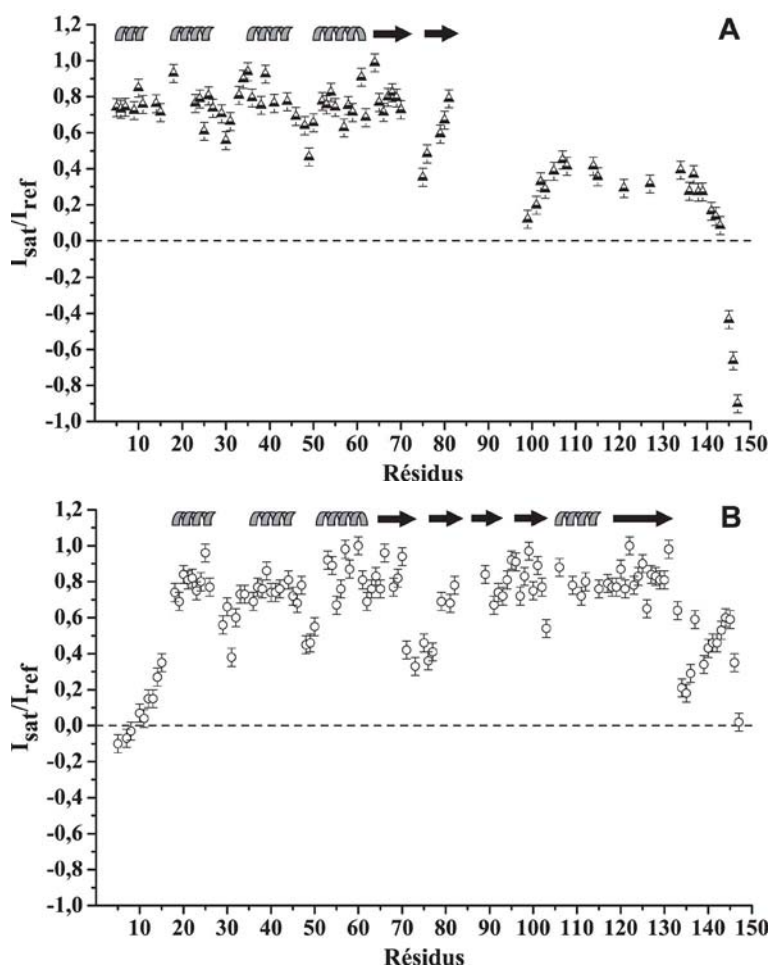


Figure IV.14 : NOE ^1H - ^{15}N enregistré à 600 MHz à l'équilibre du monomère (A) et du dimère (B).

Les NOEs hétéronucléaires ^1H - ^{15}N permettent de confirmer d'une part la localisation des structures secondaires (qui ont bien un NOE hétéronucléaire $> 0,7$) et d'autre part de confirmer l'observation de l'hélice α N terminale du monomère. En effet, les résidus 5 à 9 du monomère ont un NOE hétéronucléaire $> 0,7$ dans le monomère alors que les mêmes résidus dans le dimère ont un NOE hétéronucléaire < 0 traduisant une dynamique importante de ces résidus incompatible avec la présence d'une hélice.

En ce qui concerne la partie C-terminale, l'absence de structuration observée par l'analyse des déplacements chimiques secondaires est également confirmée par les valeurs des NOEs hétéronucléaires. Celles-ci indiquent que le domaine C-terminal est bien plus flexible dans le monomère que dans le dimère. L'analyse des NOE hétéronucléaires des résidus compris entre les positions 109 et 140, pour lesquels la mesure a pu être faite, suggère que cette région n'est probablement pas complètement déstructurée puisque la moyenne de cette zone est de 0,34.

Les valeurs des NOEs hétéronucléaires au niveau des derniers résidus du monomère (140 à 147) sont très inférieures à celles des mêmes résidus dans le dimère. Le comportement dynamique de cette zone est donc très différent et l'extrémité C-terminale du dimère est plus rigide que celle du monomère. L'interaction de l'extrémité N-terminale d'une sous-unité avec l'extrémité C-terminale de l'autre sous-unité a été mise en évidence par les expériences de pontage à l'EDC sur Zn_3FUR_D ((7) et papier 1 en annexe). Le pontage identifié se réalise entre l'amine N-terminale d'une sous-unité et un résidu acide non identifié mais situé dans les 10 derniers résidus de l'autre sous-unité. Cette interaction pourrait donc participer à la diminution de flexibilité des résidus C-terminaux du dimère. Ces observations en cross-link sont tout à fait en accord avec les données de NOE hétéronucléaires du dimère qui montrent que la flexibilité des résidus 135 à 147 diminue régulièrement, les résidus H144 et E145 étant les moins flexibles de cette région. On peut d'ailleurs proposer que le résidu E145 soit le résidu de la partie C-terminale à l'origine du pontage observé.

IV.6 Conclusions sur le processus de dimérisation et proposition d'un modèle de dimérisation

Le monomère oxydé possède 2 ponts disulfures entre les cystéines 92/95 et 132/137 (Figure IV.15). L'ajout de DTT n'entraîne pas de changements de conformations majeurs. La chélation du Zn^{2+} par les C92 et C95 et deux autres ligands modifie fortement la structure de la protéine avec la formation des brins $\beta 3$, $\beta 4$ (cyan) et $\beta 5$ (marron) et de l'hélice $\alpha 5$ (magenta). Cette structuration entraîne la dimérisation de FUR, le dimère étant stabilisé par des interactions $\alpha 5/\alpha 5'$ et $\beta 5/\beta 5'$. La dimérisation s'accompagne de la déstructuration de l'hélice N terminale $\alpha 1$ (bleue) probablement due à des interactions entre les extrémités N-terminale et C-terminale des deux sous-unité de la protéine. L'activation du dimère par du Fe^{2+} (ou Zn^{2+} ,

Mn²⁺...) entraîne un changement conformationnel augmentant l'exposition au solvant de l'hélice $\alpha 4$ (rouge) (7) permettant l'interaction avec l'ADN. L'hélice $\alpha 1$ se reformerait peut être lors de l'activation du dimère.

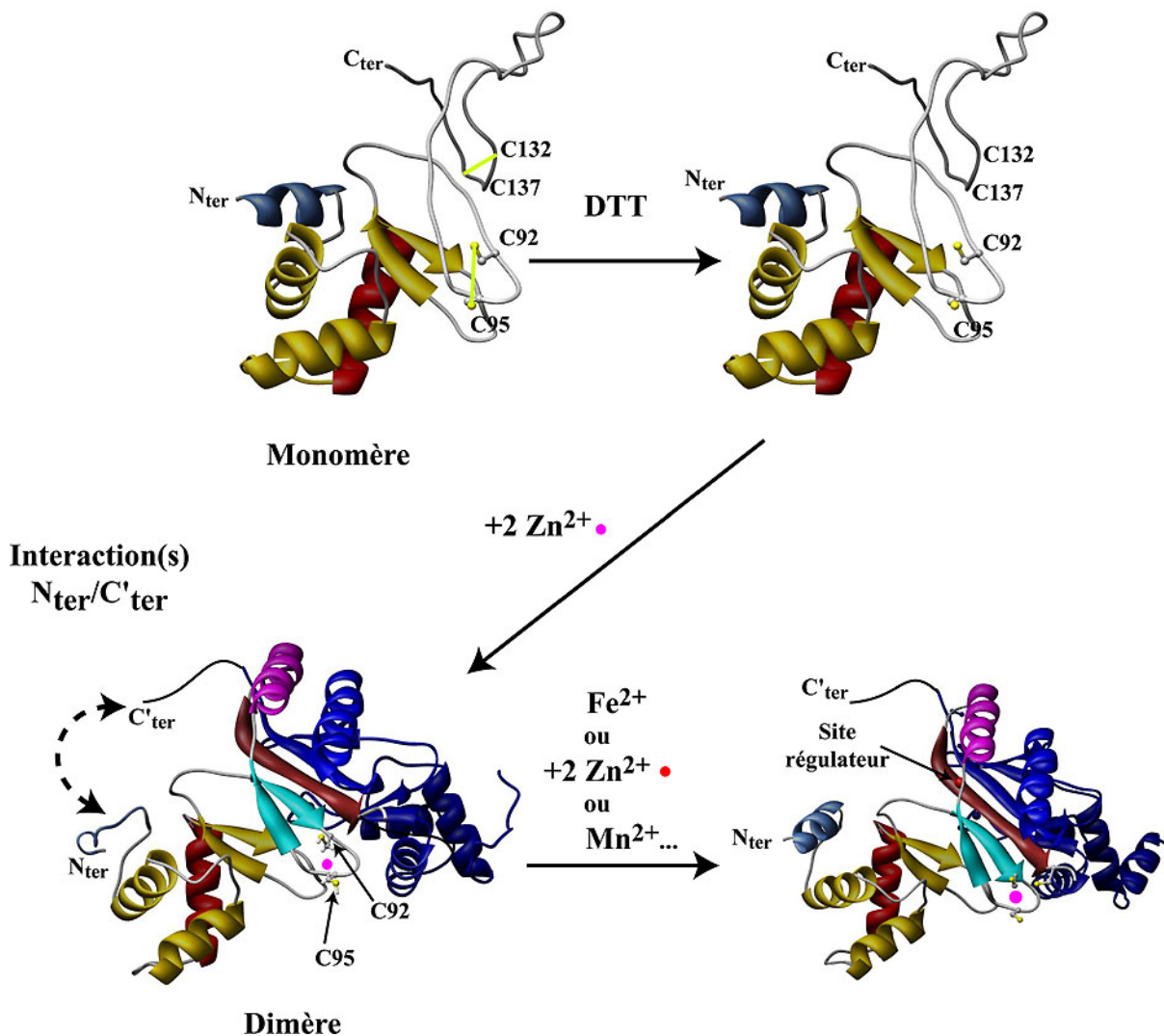


Figure IV.15 : Modèle représentant les mécanismes hypothétiques impliqués lors de la dimérisation de *E.coli* FUR.

De nouvelles questions surviennent au regard des résultats obtenus par RMN concernant le passage monomère/dimère. Le fait que le domaine N terminal du monomère possède toutes les hélices observées dans le dimère de Zn_RZn_SFUR_D de *P.aeruginosa* soulève la question de son activité quant à sa liaison à l'ADN. De plus, le monomère possède aussi tous les ligands proposés pour le site de régulation. Le monomère est-il capable de lier des ions métalliques ? C'est ce que nous allons voir dans le chapitre suivant.

Références bibliographiques

1. Adrait A, Jacquamet L, Le Pape L, Gonzalez de Peredo A, Aberdam D, et al. 1999. Spectroscopic and saturation magnetization properties of the manganese- and cobalt-substituted Fur (ferric uptake regulation) protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38: 6248
2. Althaus EW, Cao H, O'Halloran TV. 1999. The Ferric Uptake Regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* 38
3. Braun V, Schäffer S, Hantke K, Tröger W. 1990. Regulation of Gene Expression by Iron. In *The Molecular Basis of Bacterial Metabolism. Colloquium Mosbach 1990*, pp. 165. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
4. Coy M, Doyle C, Besser J, Neilands JB. 1994. Site directed mutagenesis of the ferric uptake regulation gene of *Escherichia coli*. *Biometals* 7: 292
5. D'Autréaux B. 2002. *Etudes spectroscopiques de la protéine FUR (Ferric Uptake Regulation). Interaction avec le monoxyde d'azote*. Scientific thesis. UJF, Grenoble
6. del Cardayre S, Neilands JB. 1991. Structure-activity correlations for the ferric uptake regulation (FUR) repressor protein of *Escherichia coli* K-12. In *Iron Biominerals*, ed. RE Frankel, pp. 387. New York: Plenum Press
7. Gonzalez de Peredo A. 2000. *Etude structurale de la protéine FUR (Ferric Uptake Regulation) d'Escherichia coli par spectrométrie de masse*
8. Gonzalez de Peredo A, Saint-Pierre C, Adrait A, Jacquamet L, Latour JM, et al. 1999. Identification of the two zinc-bound cysteines in the ferric uptake regulation protein from *Escherichia coli*: chemical modification and mass spectrometry analysis. *Biochemistry* 38: 8582
9. Jacquamet L, Aberdam D, Adrait A, Hazemann JL, Latour JM, Michaud-Soret I. 1998. X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the fur protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 37: 2564
10. Li R, Nagai Y, Nagai M. 2000. Changes of tyrosine and tryptophan residues in human hemoglobin by oxygen binding: near- and far-UV circular dichroism of isolated chains and recombined hemoglobin. *J Inorg Biochem* 82: 93
11. Michaud-Soret I, Adrait A, Jaquinod M, Forest E, Touati D, Latour JM. 1997. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis of the Apo- and Metal- Substituted Forms of the FUR Protein. *FEBS Letters* 413: 473
12. Pohl E, Haller JC, Mijovilovich A, Meyer-Klaucke W, Garman E, Vasil ML. 2003. Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* 47: 903
13. Sreerama N, Woody RW. 2004. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol* 383: 318

14. Stojilkovic I, Hantke K. 1995. Functional domains of the Escherichia coli ferric uptake regulator protein (Fur). *Molecular General Genetic* 247: 199
15. Woody RW. 1994. Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins. *Eur Biophys J* 23: 253

Chapitre V

Liaison du métal

Nous venons de voir que les structures secondaires du dimère de FUR d'*E. coli* étaient très semblables à celle de FUR de *P.aeruginosa* métallée par du zinc exceptée l'hélice N-terminale. Par contre cette hélice ainsi que toutes les structures secondaires du domaine N-terminal du monomère semblent être aussi conservées. Pourtant des changements conformationnels importants lors de la métallation du dimère ont été montrés par les études d'échanges hydrogène-deutérium réalisées par A. Gonzalez de Peredo au laboratoire (5). Ces données montraient que la protéine métallée est plus « ouverte » une fois que le métal (manganèse dans ces expériences) est fixé. De même, des expériences antérieures de protéolyse limitée avaient aussi montré une plus grande accessibilité de la structure aux protéases après fixation du métal (3). Au regard de toutes ces informations, de nouvelles questions se posent. Quels sont les changements structuraux du dimère lors de l'activation par un dication ? D'autre part, B. D'Autréaux a montré pendant sa thèse ((4) et V.1.1) que le monomère est également capable de lier du cobalt(II) ou du fer(II) dans un site qui a des propriétés spectroscopiques proches du site d'activation du dimère. Cette liaison entraîne t'elle une structuration du domaine C-terminal du monomère ?

Pour essayer de répondre aux questions sur les changements structuraux des analyses par dichroïsme circulaire et par RMN ont été réalisées sur le monomère et sur le dimère en présence de zinc(II) ou de manganèse(II). Les questions concernant la capacité de liaison à l'ADN seront abordées dans le chapitre suivant.

V.1 Etude de la liaison du métal des formes monomérique et dimérique

V.1.1 Rappel sur les propriétés des sites de régulation du dimère et du monomère

Nous avons vu au chapitre I les propriétés des deux types sites métalliques trouvés dans le dimère de FUR d'*E.coli* : un site tétraédrique à zinc avec notamment les cystéines 92 et 95 comme ligands du zinc, et un site de régulation penta ou hexacoordonné avec un environnement d'azote et d'oxygène. Le site de régulation de FUR d'*E.coli* peut être identique à celui trouvé dans FUR de *P.aeruginosa* alors que le site à zinc est différent (pas de cystéine ligand chez FUR de *P.aeruginosa*). Le schéma Figure V.1 ci-dessous rappelle le mécanisme d'activation proposé avec un changement conformationnel qui entraîne une plus grande accessibilité au solvant de l'hélice de reconnaissance $\alpha 4$, permettant la liaison spécifique à l'ADN.

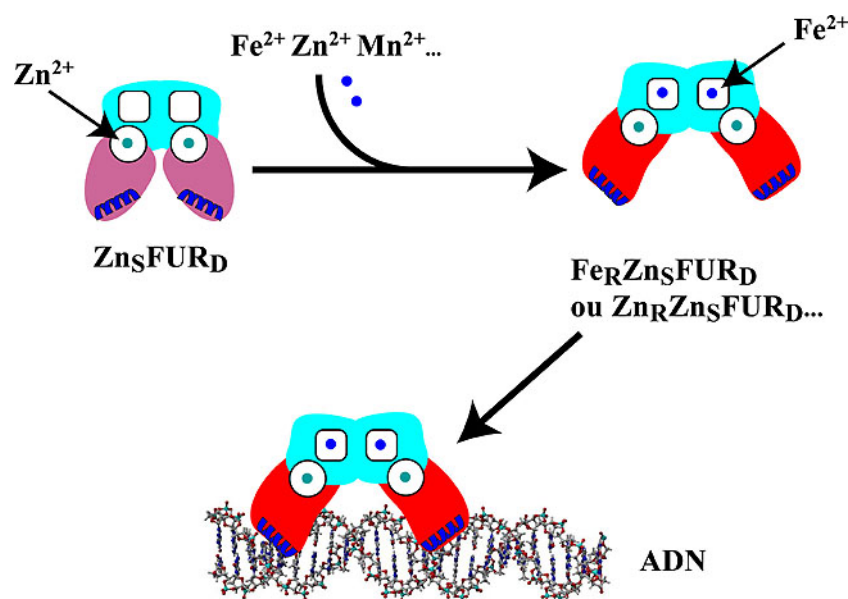


Figure V.1 : Schéma d'activation de FUR dimère. Le domaine de liaison à l'ADN est représenté en rouge, le domaine de dimérisation en cyan. Les cercles correspondent aux sites structuraux et les carrés arrondis aux sites régulateurs.

Comme nous venons de le voir, il existe aussi des formes monomériques de FUR, réduite et oxydée. Nous venons de décrire, dans le chapitre précédent, les changements structuraux de ces monomères lors de la métallation par le zinc.

Benoît D'Autréaux a montré au cours de sa thèse que malgré l'oxydation des thiols condamnant le site structural à zinc, il existait dans cette forme un autre site métallique bien défini dont les propriétés sont très proches de celles du site de régulation présent dans le dimère.

Nous allons décrire brièvement les données spectroscopiques sur ce site métallique présent dans le monomère FUR_{Mox} d'*E.coli*, car, comme nous le verrons, il va être essentiel à l'activité du monomère pour la liaison à l'ADN (cf Chap VI).

Dans sa thèse B. D'Autréaux avait décrit tout d'abord les propriétés de métallation par le cobalt(II).

Le spectre d'absorption électronique dans le domaine UV-visible de la protéine monomérique oxydée reconstituée avec 1 équivalent de cobalt (forme $CoFUR_M$) issu d'une solution de sulfate de cobalt est présenté Figure V.2

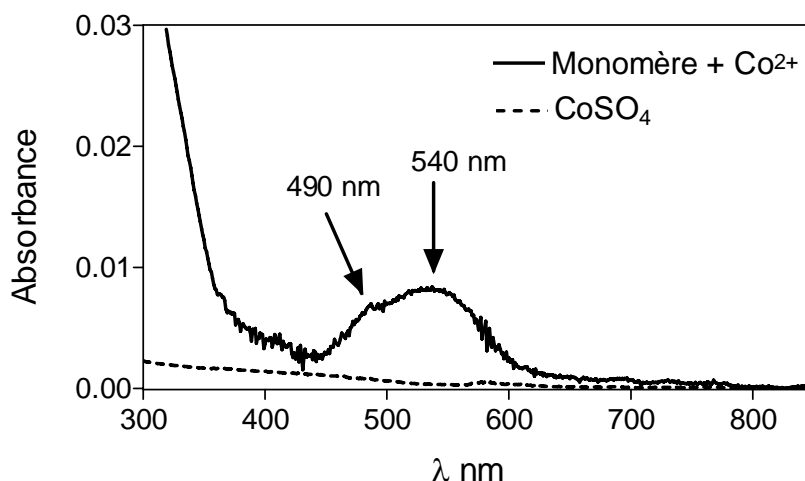


Figure V.2 : Spectre d'absorption de la protéine monomérique à une concentration de 120 μ M dans un tampon Tris/HCl 0,1M, KCl 0,1M à pH = 8, reconstituée avec 1 équivalent de Co²⁺ (trait plein). Spectre d'une solution de CoSO₄ à une concentration 1 mM dissous dans un tampon Tris/HCl 0,1M, KCl 0,1M à pH = 8 (trait pointillé). (repris de la thèse de B. D'Autréaux (4))

Lors de l'addition de Co²⁺, deux bandes apparaissent à 490 nm et 540 nm. Ce spectre est similaire à celui du dimère Co_RZn_SFUR_D obtenu par Adrait et *al.* où des bandes d'absorption à 480 nm et 540 nm ($\epsilon = 66 \pm 5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ont été observées (1). La valeur du coefficient d'absorption à 540 nm a été estimée à environ $60 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Cette valeur est compatible avec un site hexacoordonné comme dans le cas du dimère.

Sachant que le cobalt est capable d'entraîner la dimérisation du monomère réduit, du DTT a été ajouté sur l'échantillon. Ceci a donné le spectre de la Figure V.3. On observe un changement lent de spectre avec l'apparition de deux bandes intenses dans le proche UV à 360 nm et 315 nm, ainsi que des bandes de plus faible intensité dans le domaine visible à 480 nm, 600 nm, 660 nm et 715 nm. Une analyse par filtration sur gel a permis de montrer que ce changement est concomitant à la dimérisation.

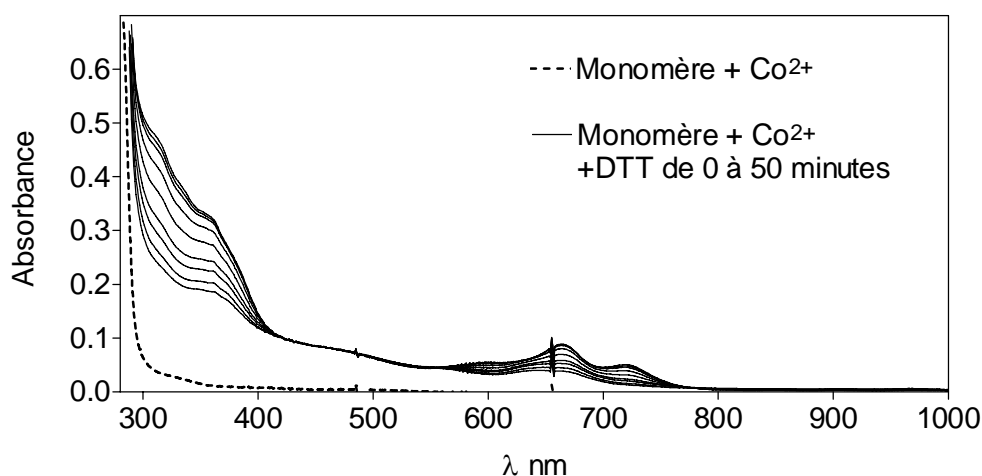


Figure V.3 : Spectre d'absorption de la protéine monomère CoFUR après réduction par le DTT (repris de la thèse de B. D'Autréaux (4)). La protéine monomère à une concentration de 120 μ M dans un tampon Tris/HCl 0,1M, KCl 0,1M

équilibré à pH = 8, a été reconstituée avec 1 équivalent de Co^{2+} . Les spectres ont été obtenus entre 0 et 50 minutes après réduction par 4 équivalents de DTT dans la cuve et sans agitation.

En effet, ce spectre est identique au spectre du dimère ayant incorporé du cobalt dans le site structural. Les bandes situées entre 500 nm et 750 nm sont attribuables à des bandes d-d. Le coefficient d'absorption à 660 nm est de $750 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et indique un nombre de coordination de 4 pour le Co(II) . La bande de plus faible énergie à 715 nm est caractéristique d'une transition d-d pour un ion Co(II) dans une géométrie tétraédrique (2).

Les bandes les plus intenses à 315 nm et 360 nm sont caractéristiques des bandes de transfert de charge $\text{L} \rightarrow \text{Co(II)}$ (2, 7, 9). Des corrélations empiriques ont été établies entre le nombre de soufre coordonnés et les coefficients d'absorption des bandes de transfert de charge $\text{S} \rightarrow \text{Co(II)}$. Des valeurs comprises entre 900 et $1400 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ont été obtenues pour un soufre coordonné. Avec la protéine Co_1FUR_D purifiée, le coefficient d'absorption déterminé à 360 nm est de $2700 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et est compatible avec au moins deux ou trois sulfures coordonnés.

Ces données montrent que le cobalt est tétracoordonné par au moins deux sulfures dans une géométrie tétraédrique. Les caractéristiques de ce site sont similaires à celles décrites pour le zinc. De plus, l'ajout d'un équivalent de Zn^{2+} au monomère réduit suivi de l'addition après quelques minutes d'un équivalent de Co^{2+} ne provoque pas l'apparition du spectre de Co_5FUR_D mais de celui de $\text{Co}_R\text{Zn}_5\text{FUR}_D$. Ces résultats suggèrent que le cobalt et le zinc vont dans le même site après réduction par le DTT. On peut également conclure que le cobalt dans le monomère oxydé $\text{CoFUR}_{\text{Mox}}$ occupe un site analogue au site de régulation dans la protéine $\text{M}_R\text{Zn}_5\text{FUR}_D$.

De même, lorsque le monomère oxydé est traité en anaérobiose par du Fe(II) , l'ion métallique se lie dans un site bien défini dont les paramètres Mössbauer $\Delta E_Q = 3,38 \text{ mm.s}^{-1}$ et $\delta_{\text{Fe}} = 1,20 \text{ mm.s}^{-1}$ (4), sont très proches de ceux obtenus pour le site de régulation dans la protéine $\text{M}_R\text{Zn}_5\text{FUR}_D$ ($\Delta E_Q = 3,47 \text{ mm.s}^{-1}$ et $\delta_{\text{Fe}} = 1,19 \text{ mm.s}^{-1}$ (6)). La spectroscopie Mössbauer est sensible à la structure électronique du fer. Les deux paramètres accessibles sans champ magnétique appliqué sont l'écart quadrupolaire ΔE_Q et le déplacement isomérique δ . Ils fournissent des informations sur le degré d'oxydation, l'état de spin du fer et parfois la nature de l'environnement autour du fer. Ces paramètres indiquent que le fer présent dans le monomère oxydé est également dans un état Fe(II) haut spin, dans un environnement octaédrique composé d'atomes d'azote et d'oxygène.

Par contre l'ion ferreux dans le monomère n'est pas stable à l'air (Figure V.4), contrairement à celui fixé au site de régulation du dimère. L'ouverture à l'air de l'échantillon $\text{Fe(II)FUR}_{\text{Mox}}$ provoque l'apparition d'une bande large centrée à 305 nm alors que cette bande n'est pas observable sur le spectre de la protéine dimère $\text{Fe(II)Zn}_5\text{FUR}_D$ préparée en anaérobiose après ouverture à l'air. La Figure 5.6B représentant l'évolution

des spectres d'une solution de fer dans le tampon suggère que cette bande provient de l'oxydation par l'oxygène de l'air des ions ferreux en ions ferriques. L'instabilité du fer dans le monomère peut être expliquée par la flexibilité du domaine C-terminal qui est moins structuré, on peut donc supposer que le fer est plus labile dans le monomère que dans le dimère.

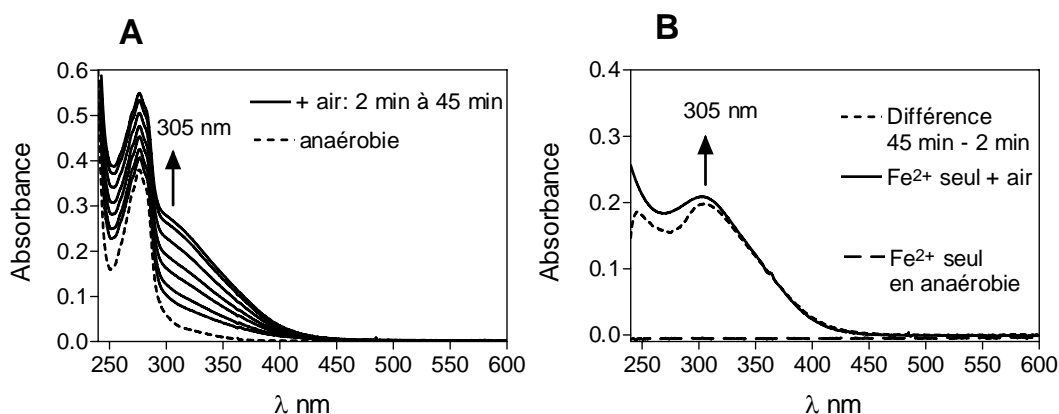


Figure V.4 : Spectre d'absorption électronique. (A) Monomère à une concentration de 56 µM dans un tampon BTP 0,1M, KCl 0,1M, pH = 7,5 + 1 éq de Fe^{2+} préparé en anaérobiose. Spectre enregistré en anaérobiose (trait pointillé), spectres enregistrés 2, 5, 10, 15, 22, 35 et 45 minutes après ouverture à l'air (traits pleins). (B) Comparaison des spectres de différence du monomère + Fe^{2+} entre 45 minutes et 2 minutes après ouverture à l'air et d'une solution de sel de Mohr ($\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) à 55 µM dans le tampon BTP 0,1M, KCl 0,1M à pH = 7,5 avant et après ouverture à l'air. (Repris de la thèse de B.D'Autrèaux (4))

L'ensemble de ces résultats suggère que le monomère oxydé possède un site de liaison du métal qui est différent du site structural à zinc du dimère, mais qui a des propriétés très proches de celles du site de régulation dans le dimère. C'est à dire une géométrie octaédrique avec une sphère de coordination du métal constituée exclusivement d'azotes et d'oxygènes.

Nous pouvons espérer que les analyses par dichroïsme circulaire et par RMN de la métallation du dimère et du monomère nous apporteraient des informations structurales intéressantes quant aux changements conformationnels engendrés par la fixation des ions métalliques.

V.1.2 Etude structurale de l'activation de FUR_M et Zn_RFUR_D par le zinc

Nous avons enregistré des spectres ^1H - ^{15}N HSQC du monomère et du dimère lors d'une titration de la protéine par du Zn^{2+} . Le zinc a été choisi pour ces études car sa sous couche électronique d est d^{10} (pas d'électron célibataire) et il est donc diamagnétique. De ce fait, il ne posera pas de problème de relaxation paramagnétique et de déplacement chimique paramagnétique. Il ne perturbera donc pas l'analyse par RMN des changements structuraux de FUR d'*E.coli* suite à son activation par un dication.

V.1.2.1 Etude de l'activation du monomère par RMN

Le suivi par RMN de la titration de 1,5 mM de FUR_{Mox} monomère par du ZnSO₄ à 20 mM de 0 à 0,75 équivalents montre qu'il n'y a pas de changements majeurs intervenant lors de l'incorporation du zinc. En effet, les spectres sont superposables (Figure V.5) ce qui indique que la liaison du métal dans le monomère n'induit pas un changement conformationnel important. Par contre, on observe une diminution du signal au cours de la titration due à la précipitation métal dépendante du monomère (Figure V.6). Si l'on compare les spectres obtenus à 0 et 0,5 équivalents de ZnSO₄ (Figure V.5E), l'intensité du signal des résidus F79, E80, Q83, Q84, L121 et L128 diminue plus vite que pour l'ensemble des autres résonances. Ces résidus appartiennent aux brins β 2 et β 5. Ils sont proches des résidus impliqués dans la coordination du métal du site régulateur dans le dimère Zn_RZn_SFUR_D de *P.aeruginosa* et dont les équivalents chez *E.coli* sont H86, D88, E107 et H124.

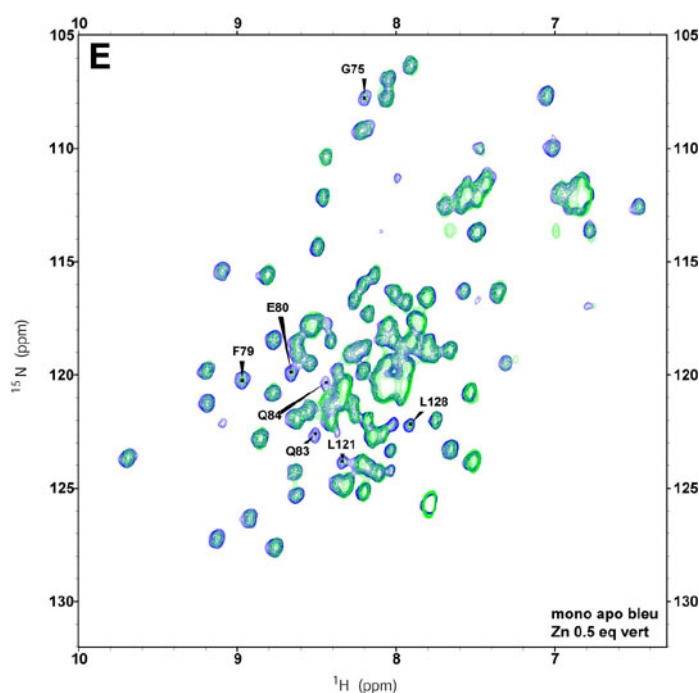


Figure V.5 : Superposition des spectres obtenus à 0 et 0,5 équivalents de ZnSO₄. L'intensité des signaux des résidus F79, E80, Q83, Q84, L121 et L128 semble diminuée plus vite que pour les autres résidus. Ceci suggère que ces résidus sont proches du site de liaison du métal. La présence du Zn²⁺ augmenterait la relaxation de ces résidus expliquant la diminution de l'intensité du signal.

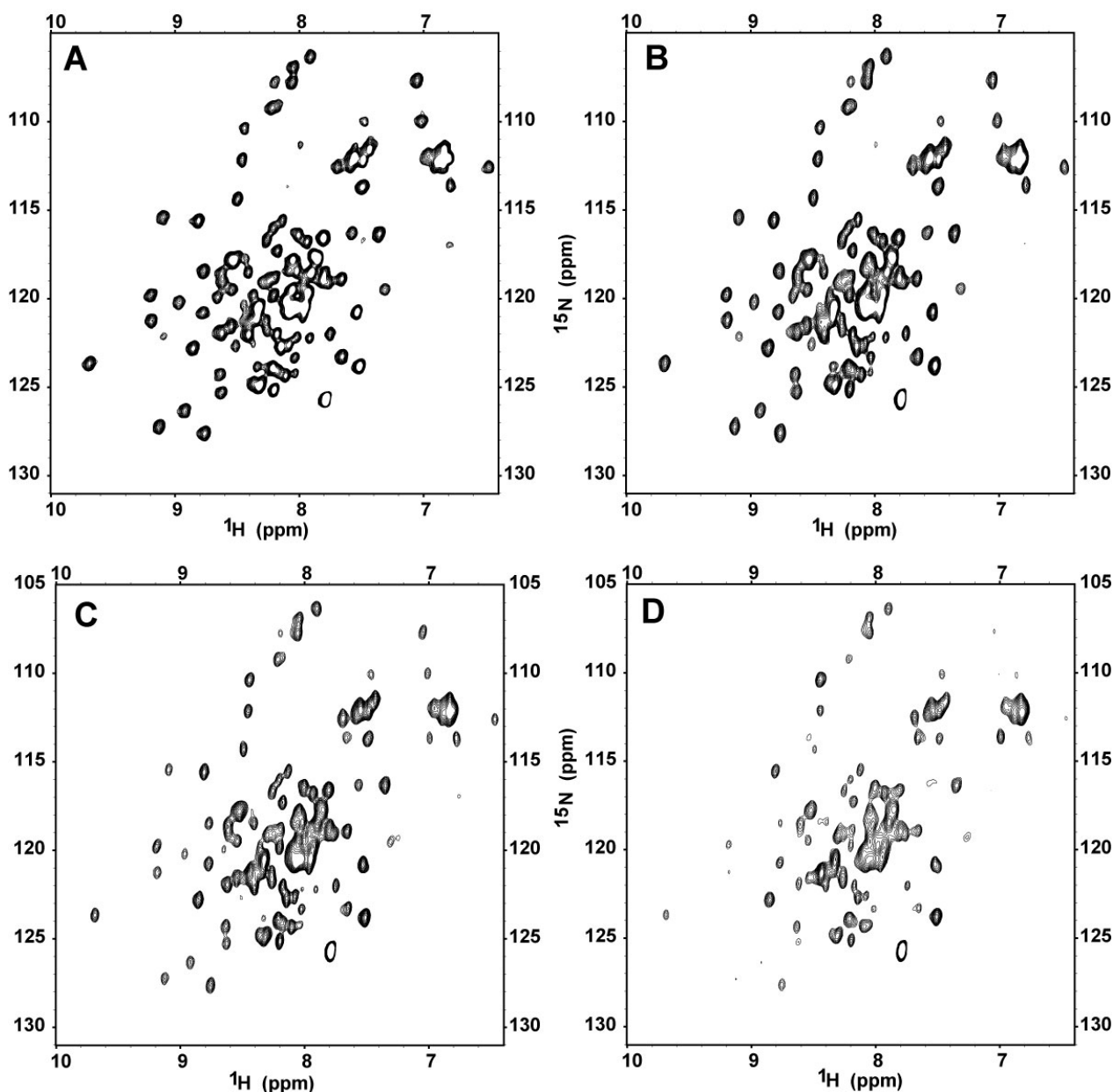


Figure V.6 : Titration de 1,5 mM d'apo monomère dans MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7,5 par du ZnSO_4 20 mM de 0,25 à 0,75 équivalents. Monomère contrôle (A) ; monomère 0,25 équivalent ZnSO_4 (B) ; 0,5 équivalent ZnSO_4 (C) ; 0,75 équivalent ZnSO_4 (D). L'ajout de ZnSO_4 n'entraîne pas de changements spectraux importants. Par contre, une perte de signal est observée du fait de la précipitation métal-dépendante de la protéine (A-D).

V.1.2.2 Etude de l'activation du monomère par dichroïsme circulaire

Pour confirmer les résultats obtenus par RMN, nous avons également réalisé une titration du monomère avec du Mn^{2+} suivie par dichroïsme circulaire. Dans cette expérience, des échantillons de 10 μM de monomère ont été titrés par des concentrations croissantes de Mn^{2+} . Les résultats sont présentés dans la Figure V.7.

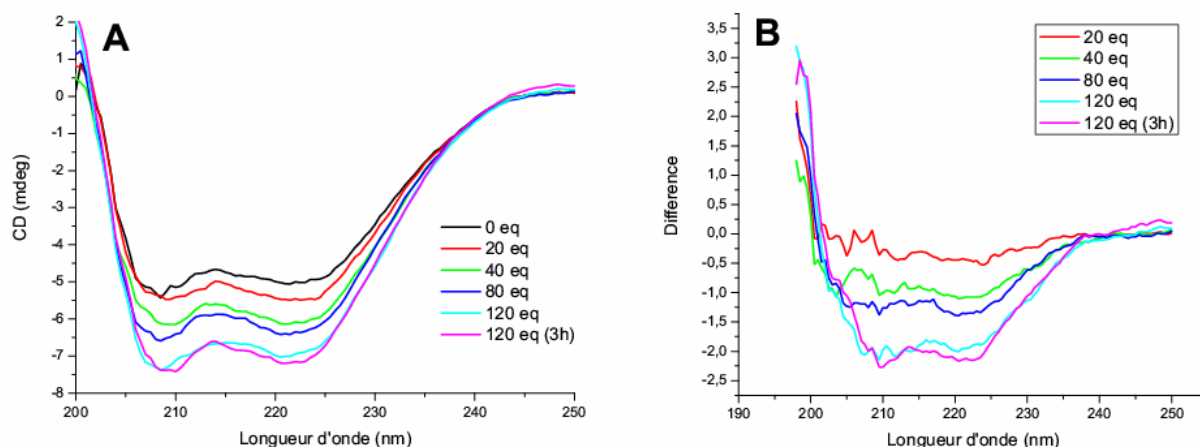


Figure V.7 : A) Spectres de dichroïsme circulaire de 10 μM de monomère en présence de concentrations croissantes en Mn^{2+} (0 à 120 équivalents). B) Spectre de différence des spectres du monomère en présence de Mn^{2+} avec le spectre de l'apo monomère.

L'augmentation de l'ellipticité molaire à 209 et 222 nm semble montrer une structuration en hélice α du monomère lors de l'incorporation de Mn^{2+} . La précipitation du monomère n'est pas observée dans les conditions de l'expérience car elle aurait abouti à une perte de signal. Ceci est probablement dû au fait que le manganèse est plus stable que le zinc qui précipite dans nos conditions de pH. Ces résultats semblent contradictoires avec ceux observés par RMN. Afin de voir si le Zn^{2+} est à l'origine de ces différences, il aurait été nécessaire de refaire cette expérience en présence de Zn^{2+} et de comparer les résultats obtenus avec les deux métaux. Néanmoins, l'observation d'une structuration de la protéine lors de la métallation du monomère n'est pas absurde. En effet, si l'on regarde les déplacements chimiques secondaires (CSI) au niveau des résidus 105 à 115, malgré les résidus non attribués, il semble que cette région soit légèrement structurée en hélice α (Figure IV.12). La fixation du Mn^{2+} pourrait stabiliser cette hélice, le résidu E107 étant impliqué dans la coordination du métal au niveau du site régulateur d'après la structure cristallographique de $\text{Zn}_R\text{Zn}_S\text{FUR}_D$ de *P.aeruginosa* (8).

V.1.2.3 Etude de l'activation du dimère par RMN

Les changements spectraux observés lors de la titration de 1,1 mM de apo FUR dimère (Zn_SFUR_D) par une solution de ZnSO_4 à 20 mM de 0 à 2 équivalents montrent que le dimère change de conformation lors de l'incorporation du Zn^{2+} (Figure V.8).

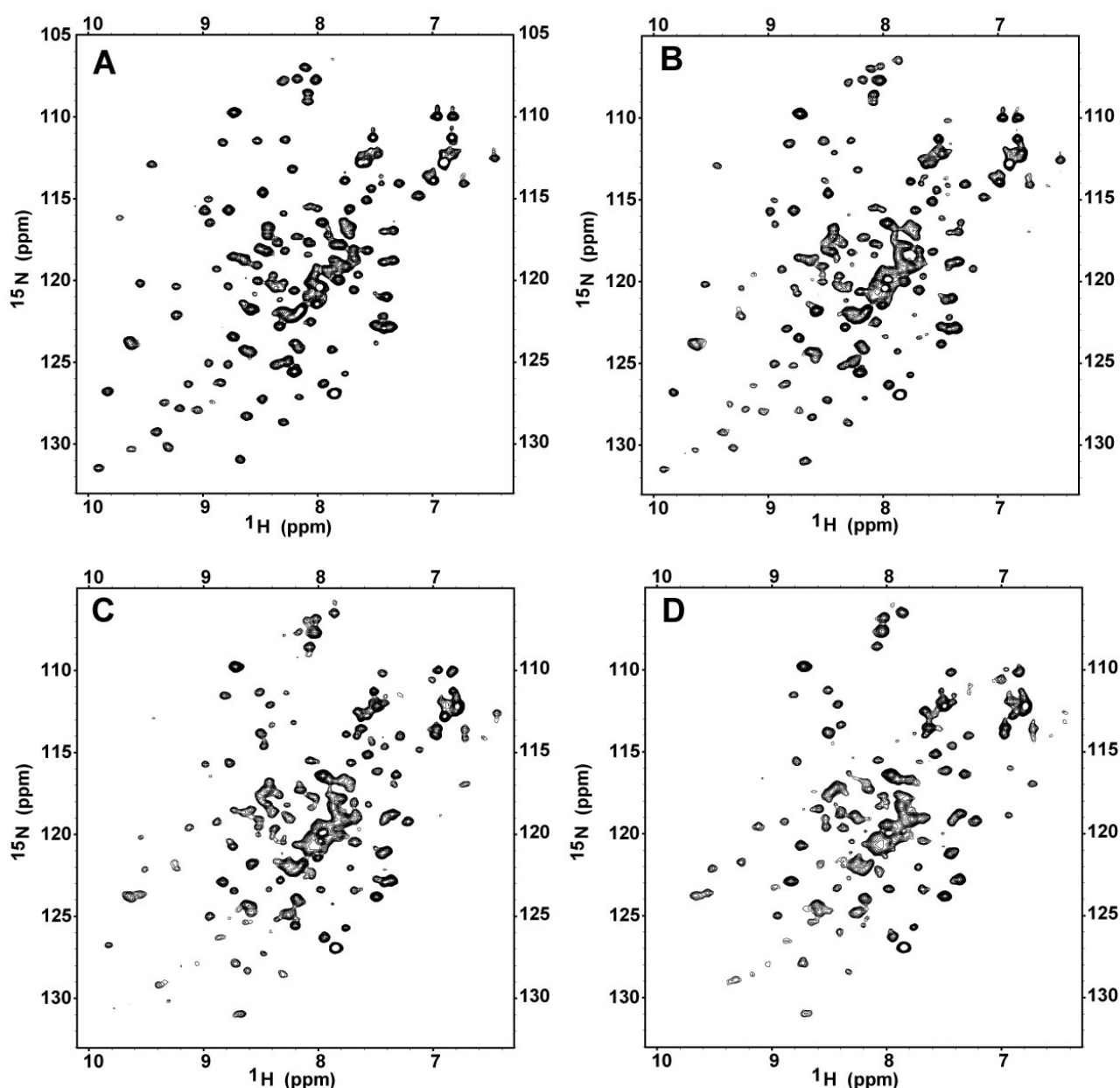


Figure V.8 : Titration de 1,1 mM de FUR dimère dans MOPS 100 mM KCl 500 mM par du ZnSO_4 20 mM de 0,5 à 2 équivalents de Zn^{2+} par sous-unité par pas de 0,5. Dimère contrôle (A) ; 0,5 eq ZnSO_4 (B) ; 1 eq ZnSO_4 (C) ; 1,5 eq ZnSO_4 (D). L'ajout de ZnSO_4 entraîne des changements spectraux importants traduisant une réorganisation structurale. L'ajout de ZnSO_4 entraîne également la précipitation de la protéine. Temps d'incubation après chaque addition de 15 minutes à 298 K.

En effet, 26 pics ne sont pas modifiés, 18 résidus ont pu être attribués par l'observation des spectres, les pics de corrélations des résidus restant (soit 70%) n'ont pu être attribués directement (Tableau V.1).

Résidus dont les signaux ne sont pas modifiés
10, 19, 36, 39, 44, 46, 56, 66, 79, 85, 95, 112, 117, 118, 133, 134, 135, 136, 137, 139, 140, 141, 143, 144, 146, 147

Tableau V.1 : Tableau récapitulatif des observations réalisées lors de la titration de Zn_5FUR_D par du ZnSO_4 suivie par RMN.

Les résidus non modifiés (Tableau V.1) correspondent majoritairement aux résidus C terminaux qui ne sont pas structurés. L'incorporation du métal ne modifie donc pas l'environnement ni la structure de ces résidus. Les modifications spectrales importantes traduisent des changements conformationnels importants permettant à la protéine de se lier à l'ADN. Ces changements conformationnels ont déjà été étudiés par échange proton / deutérium et analysés par spectrométrie de masse. L'activation par le Mn^{2+} entraînait une augmentation de l'échange H/D et donc une augmentation de l'exposition au solvant de l'hélice $\alpha 4$ responsable de l'interaction de la protéine avec l'ADN (5). Cependant, pour confirmer cela par l'étude RMN, il aurait fallu attribuer toutes les résonances des résidus dont les pics de corrélations sont modifiés. Pour cela, il aurait fallu obtenir un échantillon au moins doublement marqué ^{15}N , ^{13}C pour enregistrer les expériences 3D permettant d'attribuer la chaîne principale. Malheureusement, la protéine précipite avec l'ajout de Zn^{2+} posant ainsi des problèmes de sensibilité. De plus, on peut noter une diminution de la gamme des déplacements chimiques avec une augmentation des recouvrements dans la région centrale du spectre. En l'absence d'un échantillon optimal, nous n'avons pas poursuivi dans cette voie, l'attribution risquant d'être très difficile voire impossible.

Nous avons donc essayé d'incorporer le zinc par dialyse afin de limiter la précipitation due aux fortes concentrations locales en zinc lors des ajouts successifs lors de la titration. Pour cela, nous avons incubé la protéine dimérique Zn_5FUR_D à 1 mM dans du tampon MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7,5 et dialysé contre le même tampon contenant 500 μM de $ZnSO_4$. La dialyse a été réalisée sur une nuit à 4°C. A la fin de la dialyse, l'échantillon récupéré était blanc. Après centrifugation, le surnageant est limpide mais un culot blanc est récupéré. Ce culot est solubilisé par de l'EDTA et contient donc du métal. Les spectres 2D 1H - ^{15}N HSQC du surnageant et du culot redissous ont été enregistrés (Figure V.9). Le spectre du surnageant montre bien la présence de protéine et les résonances se superposent bien avec celles du dimère activé par du zinc obtenu lors de la précédente titration. Par contre, la sensibilité de l'échantillon est faible. Le spectre du culot redissous par de l'EDTA montre également la présence de protéine indiquant que la protéine a précipité à cause du zinc. La mesure de densité optique à 277 nm du culot solubilisé montre que 20% de la protéine a précipité. Le spectre du dimère activé par dialyse n'étant pas de meilleure qualité que celui du dimère activé par addition d'une solution à 20 mM de $ZnSO_4$, la dialyse n'est donc pas une solution au problème. D'autres essais d'incorporation avec du Cd^{2+} (diamagnétique) et du Fe^{2+} (paramagnétique, métal physiologique) ont été réalisés et ont donné des résultats similaires. Le Fe^{2+} bien que paramagnétique a été testé car il s'agit du métal physiologique.

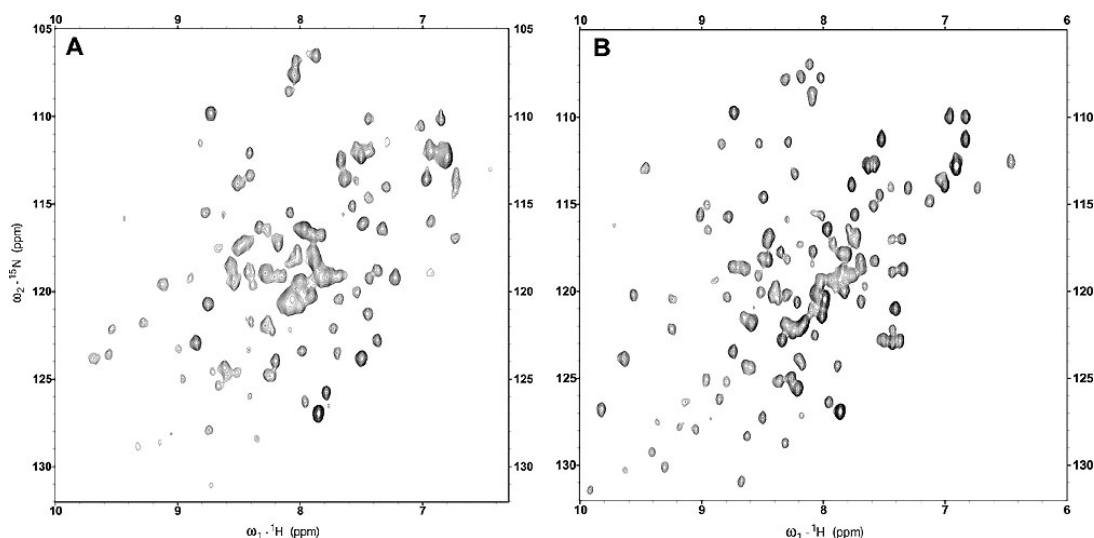


Figure V.9 : Activation de 1 mM de FUR dimère (Zn_5FUR_D) dans MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7,5 par du zinc incorporé par dialyse dans le même tampon contenant 500 μ M de $ZnSO_4$. A) spectre 2D 1H - ^{15}N HSQC 600 MHz de FUR dimère dialysé contre du tampon contenant 500 μ M de zinc. Nombre de scans =16, nombre d'incrments dans la dimension indirecte =128 B) spectre 2D 1H - ^{15}N HSQC à 600 MHz du précipité obtenu à l'issue de la dialyse et redissout dans le tampon MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7,5 contenant de l'EDTA 4 mM. Nombre de scans=32, nombre d'incrments dans la dimension indirecte=128

V.1.2.4 Etude de l'activation du dimère par dichroïsme circulaire

Des expériences d'incorporation du manganèse de l'apo dimère de FUR (Zn_RFUR_D) suivies par dichroïsme circulaire ont été réalisées. Les spectres CD obtenus montrent une diminution de l'ellipticité molaire pour les longueurs d'ondes inférieures à 210 nm concomitante avec un déplacement du minimum d'absorption de 210 à 207 nm. Sachant qu'en absence de métal, le spectre de Zn_RFUR_D est stable, ces résultats suggèrent une déstabilisation de la protéine induite par l'incorporation de Mn^{2+} . Cette observation est en accord avec les expériences d'incorporation de Zn^{2+} suivies par RMN. En effet, dans ces expériences, les recouvrements de résonances au niveau de la région centrale du spectre HSQC 1H - ^{15}N deviennent plus nombreux lors de l'ajout de Zn^{2+} .

Les expériences de dichroïsme circulaire initialement réalisées pour obtenir un K_d protéine/métal ne peuvent permettre la détermination de ce paramètre. En effet, les spectres n'ont pas été enregistrés à l'équilibre malgré une période d'incubation de 1 heure. Après 2h d'incubation, le signal n'est toujours pas constant. D'autre part, les spectres d'échantillons incubés 1 heure en présence d'un plus grand excès de métal ont une diminution de l'ellipticité molaire inférieure que pour un échantillon incubé avec moins de métal mais pendant une période plus longue (données non montrées). Ceci confirme que le phénomène observé est bien dépendant du temps. Cela suggère également que plusieurs événements avec des cinétiques différentes sont observés.

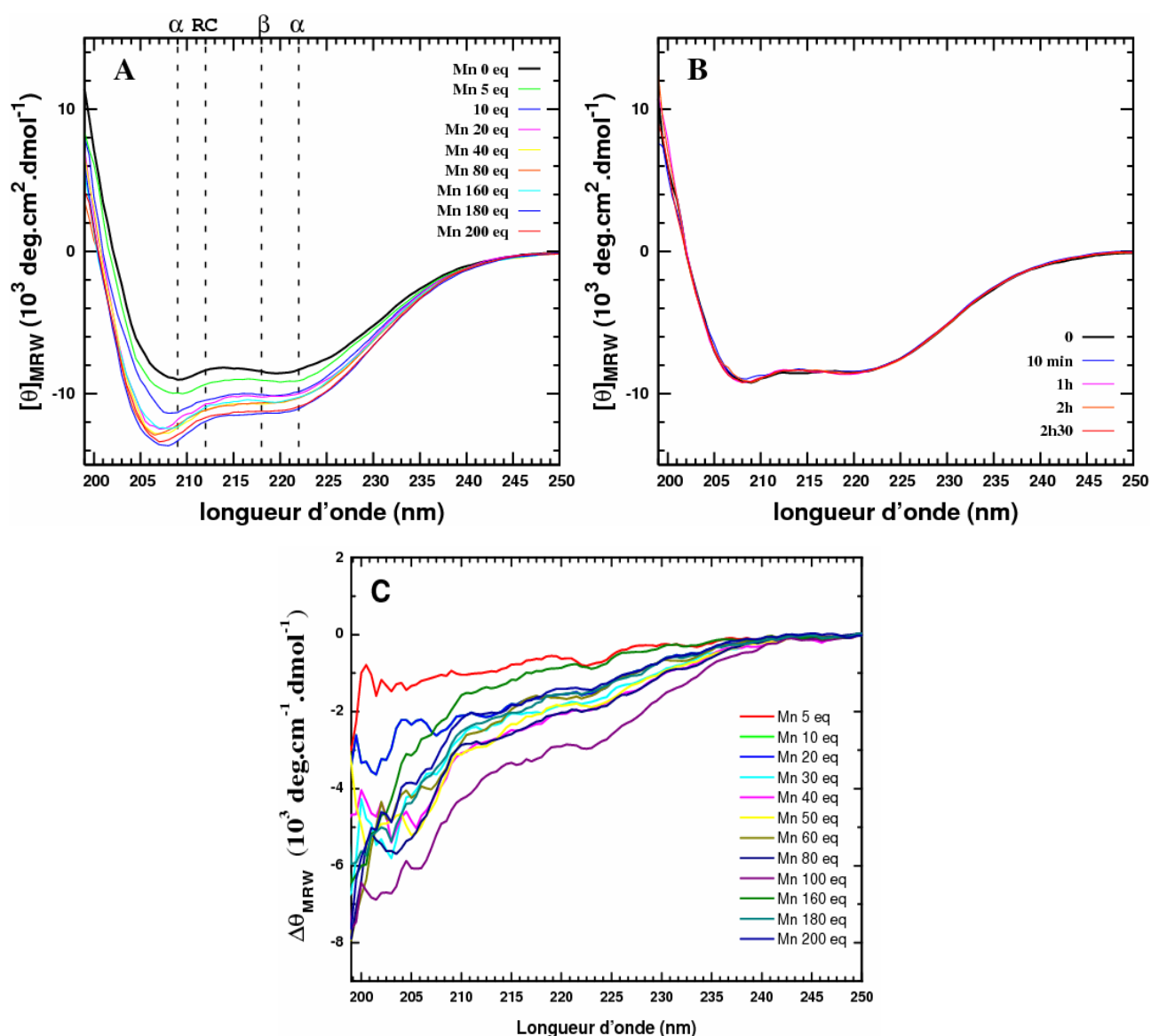


Figure V.10 : A) Spectres de dichroïsme circulaire enregistrés sur des échantillons de 10 μM de Zn_5FUR_D dans MOPS 20 mM KCl 40 mM pH 7 à 298 K en présence d'une concentration croissante en MnSO_4 et normalisés par rapport à la concentration et au nombre de résidus. Les temps d'incubations des courbes représentées sont tous de une heure. B) Spectre de dichroïsme circulaire de Zn_5FUR_D dans MOPS 20 mM KCl 40 mM pH 7 à 298 K en absence de MnSO_4 enregistrés à différents temps. C) Spectre de différence entre les spectres obtenus en présence et en absence de métal. En absence de MnSO_4 , la protéine est stable dans le temps de l'expérience.

On peut mettre en cause la faible salinité du tampon utilisé dans ces expériences. En effet, nous savons que FUR oligomérisse plus facilement à faible force ionique pour former des tétramères, des hexamères ou même des octamères (voir papier 1 en annexe). De plus, la présence d'ion métalliques favorise aussi la précipitation. Il serait intéressant de refaire ces expériences avec des temps plus courts d'incubation car on peut penser que l'oligomérisation va être lente par rapport à la métallation. Des expériences à plus fortes concentrations en protéine mais avec un moins grand excès de métal seraient aussi informatives.

V.2 Conclusions

La forme monomérique oxydée de FUR d'*E.coli* contient deux ponts disulfures entre les Cys92 et Cys95 d'une part et les Cys132 et Cys137 d'autre part. La réduction de ces ponts disulfures et l'incorporation d'un ion tel que le Zn^{2+} et le Co^{2+} permettent de former un dimère ayant des propriétés comparables à celles du dimère natif.

L'étude des formes monomériques oxydées substituées par l'ion Fe^{2+} , FeFUR_M , ou par l'ion Co^{2+} , CoFUR_M a montré qu'il existe un site de fixation de cation divalent bien défini dans cette forme de la protéine dont les propriétés spectroscopiques sont similaires au site de régulation présent dans le dimère (1, 6). Les caractéristiques spectroscopiques de ces deux sites indiquent une géométrie octaédrique avec une sphère de coordination constituée exclusivement d'azotes et d'oxygènes. Lors de la réduction du monomère oxydé, une migration de l'ion métallique de ce site octaédrique vers un site tétraédrique avec une sphère de coordination constituée de 2 thiols est observée. Les caractéristiques de ce site sont comparables à celles du site occupé par le zinc structural dans le dimère. Le fait que la migration soit concomitante à la dimérisation de la protéine est en accord avec ce que nous venons de décrire, c'est-à-dire le rôle essentiel de l'occupation de ce site (par du Zn *in vivo*) dans la dimérisation de FUR d'*E.coli*.

L'étude structurale du monomère oxydé par RMN montre que la métallation par le zinc entraîne peu de modifications du spectre. Par contre, l'analyse par dichroïsme circulaire du monomère oxydé suggère une structuration en hélice α du monomère lors de l'incorporation du Mn^{2+} . Les études d'absorption électronique et Mössbauer montrent qu'un site métallique défini existe dans cette protéine, probablement principalement dans le domaine C-terminal. Sachant que le monomère oxydé étudié reste monomérique en présence de Mn^{2+} , il semble donc que la structuration du monomère pour former un dimère, avec formation d'un long feuillet antiparallèle inter sous-unité, ne puisse se faire que par liaison d'un ion métallique au site structural contenant les deux thiols réduits Cys92 et Cys95.

Les résultats obtenus par RMN ont permis de montrer clairement le changement conformationnel important du dimère de FUR lors de la fixation du zinc. Malheureusement, une analyse de ces changements aurait nécessité une nouvelle attribution complète que nous avons choisi de ne pas réaliser. En effet, nous n'avons pas trouvé de conditions pour obtenir 100% de dimère métallé avec du zinc sans avoir soit de la précipitation de la protéine soit du dimère non-métallé. Cependant, les homologies de structures secondaires entre FUR d'*E.coli* et FUR de *P.aeruginosa* nous laissent penser que la structure du dimère métallé devrait être proche de celle de FUR de *P.aeruginosa* obtenue par cristallographie en présence de zinc excepté pour le site structural à zinc.

Maintenant que nous avons comparé les propriétés structurales des formes métallées du monomère oxydé et du dimère, il nous restait à comparer leur capacité à se lier à l'ADN. Les résultats de cette comparaison sont décrits dans le chapitre suivant.

Références bibliographiques

1. Adrait A, Jacquamet L, Le Pape L, Gonzalez de Peredo A, Aberdam D, et al. 1999. Spectroscopic and saturation magnetization properties of the manganese- and cobalt-substituted Fur (ferric uptake regulation) protein from Escherichia coli. *Biochemistry* 38: 6248
2. Bertini I, Luchinat C. 1984. High-spin cobalt(II) as a probe for the investigation of metalloproteins. *Adv. Inorg. Biochem.* 6: 71
3. Coy M, Neilands JB. 1991. Structural dynamics and functional domains of the fur protein. *Biochemistry* 30: 8201
4. D'Autréaux B. 2002. *Etudes spectroscopiques de la protéine FUR (Ferric Uptake Regulation). Interaction avec le monoxyde d'azote*. Scientific thesis. UJF, Grenoble
5. Gonzalez de Peredo A, Saint-Pierre C, Latour JM, Michaud-Soret I, Forest E. 2001. Conformational changes of the ferric uptake regulation protein upon metal activation and DNA binding; first evidence of structural homologies with the diphtheria toxin repressor. *J Mol Biol* 310: 83
6. Jacquamet L, Dole F, Jeandey C, Oddou JL, Perret E, et al. 2000. First spectroscopic characterization of Fe(II)-Fur, the physiological active form of the Fur protein. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 394
7. Lever ABP. 1984. *Inorganic Electronic Spectroscopy (second edition)*. Amsterdam: Elsevier
8. Pohl E, Haller JC, Mijovilovich A, Meyer-Klaucke W, Garman E, Vasil ML. 2003. Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* 47: 903
9. Werth MT, Tang S-F, Formicka G, Zeppezauer M, Johnson MK. 1995. Magnetic Circular Dichroism and Electron Paramagnetic Resonance Studies of Cobalt-Substituted Horse Liver Alcohol Dehydrogenase. *Inorganic Chemistry* 34: 218

Chapitre VI

Interactions protéines/ADN

Le rôle essentiel de la métallation de FUR est l'activation de la protéine pour sa fixation à l'ADN et le contrôle de l'expression de gènes. Cette activation est réalisée par un changement conformationnel qui doit permettre d'augmenter fortement l'affinité de FUR pour des séquences spécifiques d'ADN appelées « boîtes fur » ou boîtes à fer. Les propriétés de liaison à l'ADN des différentes formes de FUR étudiées, FUR_D et FUR_{Mox} ont été comparées à l'aide de différentes techniques. Nous décrirons d'abord les résultats des tests de protection à la nucléase, puis des analyses de variations d'anisotropie de fluorescence, pour finir avec ceux des expériences de retard sur gel.

Dans la littérature, seule l'activité de liaison à l'ADN de la forme dimérique est décrite. Celle-ci est dépendante du métal. Le mode de liaison à l'ADN couramment admis pour les dimères comportant un motif hélice-coude-hélice ailé est l'insertion des hélices de reconnaissance dans le grand sillon et la stabilisation de l'interaction grâce à l'aide de l'aile dans laquelle se trouve un acide aminé capable d'interagir avec les phosphate dans le petit sillon. Pour FUR de *E. coli*, cet acide aminé serait la Lys76. (6)

Il existe cependant plusieurs modèles d'interaction ayant des stœchiométries différentes.

VI.1 Le test de protection à la nucléase : Un monomère activable sous certaines conditions

Le test de protection à la coupure par la nucléase HinfI permet de mettre en évidence l'interaction protéine/ADN. Pour ce test, la séquence d'ADN du promoteur de l'aérobactine a été introduite dans un plasmide pUC 19 (3). Ce promoteur est reconnu par FUR et contient un site de restriction reconnu par l'endonucléase HinfI. En l'absence de reconnaissance du promoteur par FUR, le plasmide sera coupé par la DNase en 6 fragments dont 4 seront visibles sur un gel d'agarose à 1,5 %. Si la séquence promotrice de l'aérobactine est protégée par FUR, un site de coupure ne sera plus exposé et le plasmide sera coupé en 5 fragments dont 3 seront visibles sur gel comme le montre la Figure VI.1 (pour plus de détails, voir Matériel et Méthode).

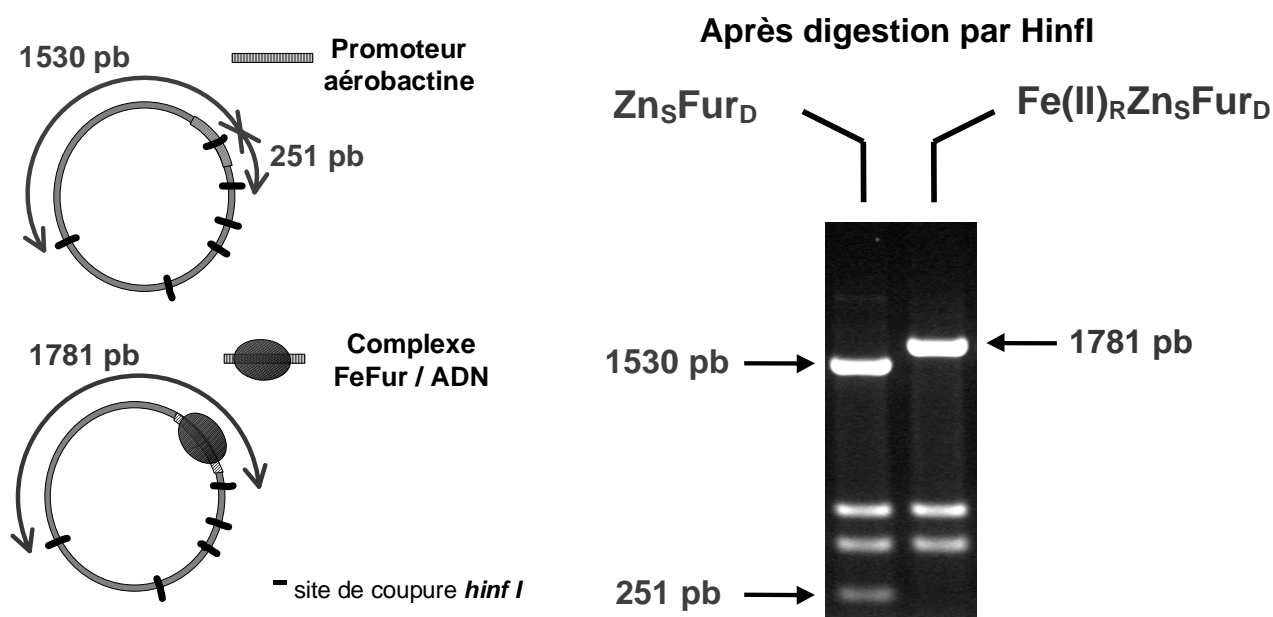


Figure VI.1 : Test de protection à la coupure par HinfI.

Jusqu'alors, aucune activité n'avait été observée pour le monomère lorsque celui-ci est en contact avec un équivalent de Fe(II) (Figure VI.2). Des expériences réalisées par B.D'Autréaux ont clairement montré une protection à la coupure par le dimère de FUR en présence de Fe(II). Par contre, aucune protection n'a été observée pour le monomère, en présence ou non de Fe(II).

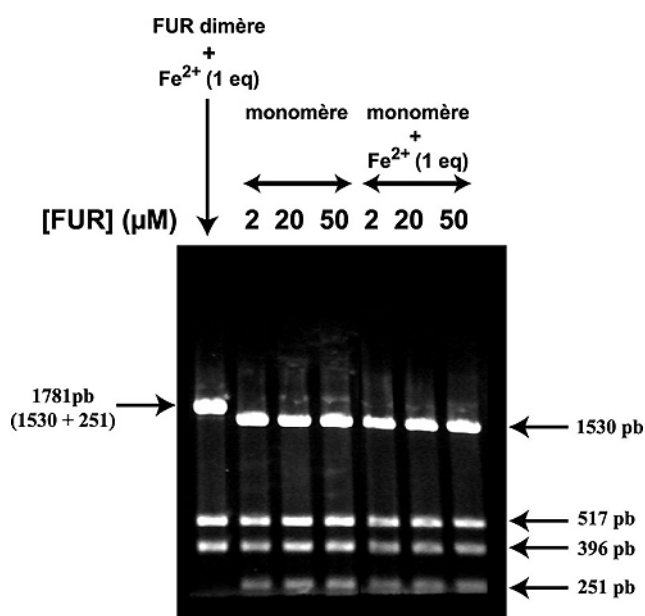


Figure VI.2 : Test d'activité de protection à la coupure par HinfI du monomère. Les réactions ont été réalisées en anaérobiose partielle (incubation de la protéine avec l'ADN et le métal en anaérobiose stricte mais incubation avec HinfI en aérobiose) avec 50 nM de plasmide pDT10 et la protéine monomère à des concentrations de 2 μ M, 20 μ M et 50 μ M en absence et présence de 1 équivalent de Fe^{2+} . Le premier puit contient de la protéine FUR dimère à une concentration de 20 μ M en présence de 1 équivalent de Fe^{2+} (issu de (3)).

Les résultats obtenus précédemment sur la forme monomérique de FUR, à savoir, sa capacité à lier un ion métallique comme le Co(II) ou le Fe(II) ainsi que l'apparente ressemblance du domaine N-terminal du monomère de FUR d'*E.coli* avec celui de la forme activée de *P.aeruginosa* FUR nous ont incité à approfondir l'étude de l'interaction du monomère avec l'ADN.

Pour ne pas être confronté aux problèmes d'oxydation du Fe(II) en aérobiose, nous avons recommencé une étude de l'interaction monomère/ADN en présence de Mn^{2+} ou de Ni^{2+} afin de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus précédemment avec le Fe^{2+} . En effet, nous avons vu au chapitre V que le Fe(II) n'était pas stable dans le monomère. Le Ni^{2+} a donc été utilisé à la place du Fe^{2+} et du Zn^{2+} pour des raisons pratiques et de reproductibilité des expériences, le fer nécessitant de travailler en anaérobie et le zinc posant beaucoup de problèmes du fait de sa précipitation à pH non acide et de la précipitation concomitante de la protéine. Le Mn^{2+} a également été utilisé car de nombreuses études ont montré l'activation du dimère de FUR d'*E.coli* par ce métal.

De plus jusqu'alors, le monomère étudié correspondait à des échantillons ayant été purifiés et conservés longtemps avant leur utilisation. Ceci pourrait expliquer l'absence de sa réactivité vis-à-vis de l'ADN.

Afin de travailler avec des préparations de monomère oxydé « frais » et exempt de monomère réduit, différentes modifications du protocole de purification ont été réalisées. Tout d'abord, pour augmenter la proportion de monomère lors de la purification, la concentration d'EDTA est multipliée par 10 (100 mM) dans le tampon d'extraction. Cela permet d'augmenter les quantités de monomère obtenues d'un facteur 2. D'autre part, il est apparu qu'à la fin de la purification, le monomère obtenu est un mélange des formes réduites et oxydées. Afin d'augmenter la proportion de monomère oxydé, le monomère purifié est stocké à température ambiante dans le tampon utilisé pendant la filtration sur gel pendant un temps variable (qui dépend de chaque purification) allant de 4 heures à 24 heures. Dans un premier temps, il a été nécessaire de trouver des conditions permettant d'obtenir du monomère oxydé homogène. En effet, la présence de monomère réduit peut fausser les résultats puisqu'en présence de métal divalent (Zn^{2+} , Mn^{2+}) le monomère réduit forme du dimère alors capable de se lier à l'ADN. Afin de sélectionner le monomère oxydé incapable de dimériser, nous avons incubé la solution de monomère en présence de métal divalent. Dans ces conditions, le monomère réduit dimérise, le monomère au moins oxydé au niveau des cystéines 92 et 95 restera monomérique. Les deux formes sont ensuite séparées par filtration sur gel afin de récupérer le monomère incapable de dimériser. Deux méthodes peuvent être utilisées, soit l'ajout de 0,5 équivalent de Zn^{2+} , soit l'ajout d'un excès (10 équivalents) de Mn^{2+} . Le zinc doit être ajouté en sous stoechiométrie pour éviter la précipitation. Cependant, l'avantage de l'utiliser est que l'on peut récupérer le dimère formé qui contient du zinc dans le site structural (métal natif). Le Mn^{2+} est plus facile à utiliser car les problèmes de précipitations n'apparaissent qu'avec des excès importants de métal. Dans ce cas, la dimérisation est moins

efficace probablement parce que l'affinité du monomère pour le Mn^{2+} est d'après les expériences plus faible que pour le Zn^{2+} d'où la nécessité de travailler en excès. Cette étape permet de sélectionner le monomère totalement oxydé ou du moins partiellement oxydé au niveau des cystéines 92 et 95 et donc du monomère incapable de dimériser (Figure VI.3).

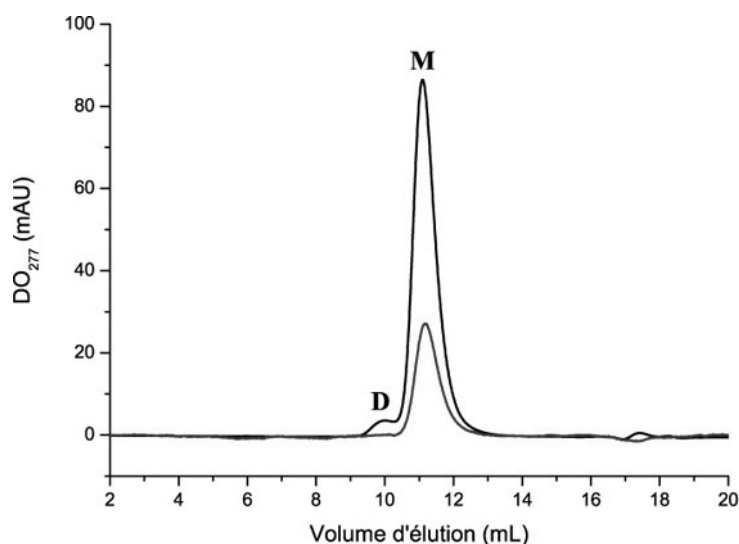


Figure VI.3 : Profil d'élution par chromatographie d'exclusion sur gel (Superdex 75 HR 10/30) d'une solution de 80 μM de monomère issu de la dernière étape de purification puis incubé 15 minutes en présence de 10 équivalents de Mn^{2+} (en noir). Profil d'élution d'une solution à 25 μM de monomère sélectionné après incubation avec 10 équivalents de Mn^{2+} (normalement incapable de dimériser) et réincubé avec 10 équivalents de Mn^{2+} (en gris). Le monomère obtenu de cette façon est incapable de dimériser. L'absence d'un pic correspondant au volume d'élution du dimère montre que le monomère oxydé reste monomère en présence d'un excès de Mn^{2+} .

A partir de ce monomère, nous avons effectué un test d'activité en présence de 0,5 à 1,5 équivalents de Ni^{2+} (Figure VI.4). Les résultats obtenus montrent clairement que le monomère est capable de reconnaître l'ADN en présence de Ni^{2+} ($NiFUR_M$). En absence de métal, le monomère ne se fixe pas sur la séquence promotrice de l'aérobactine. Par contre, dès 1 équivalent de Ni^{2+} , le monomère métallé est capable de se fixer sur cette séquence et de la protéger de la coupure par l'enzyme *HinfI*. Ces résultats sont surprenants au regard de ceux obtenus préalablement avec le fer. Néanmoins, des résultats concordants sont obtenus avec le Ni^{2+} et le Mn^{2+} avec lesquels on observe une activité de liaison à l'ADN du monomère. Le fait de ne pas avoir observé de liaison à l'ADN en présence de Fe^{2+} peut être dû à une affinité du monomère pour le Fe^{2+} très inférieure à celles du Ni^{2+} et du Mn^{2+} ou par une oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} au cours de l'expérience due à une anaérobiose insuffisante (cf chapitre V). En effet, comme expliqué dans le chapitre V, le $Fe(II)$ est moins stable dans le monomère que dans le dimère ce qui suggère que le fer est plus labile dans le monomère. De ce fait, une oxydation du $Fe(II)$ en $Fe(III)$ peut se dérouler ce qui expliquerait donc la non-liaison du monomère avec l'ADN en présence de fer.

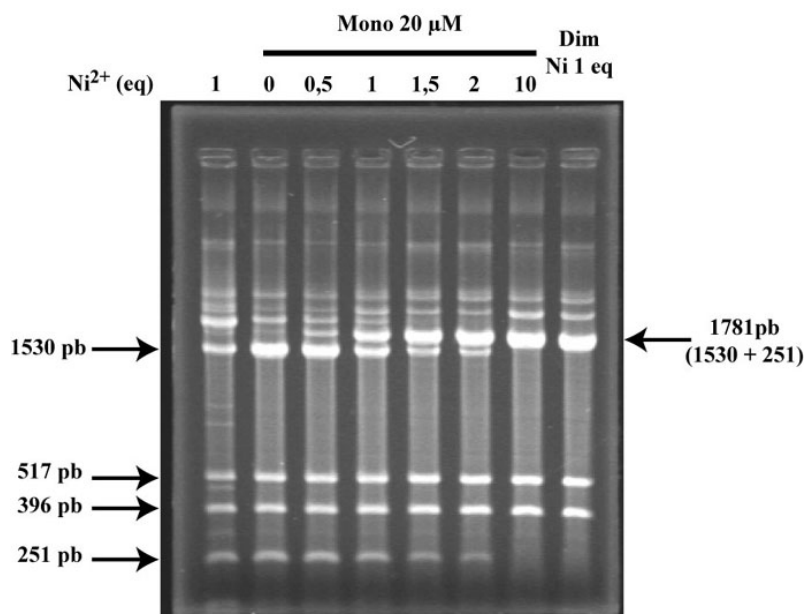
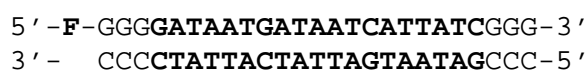


Figure VI.4 : Test d'activité de protection à la coupure par HinfI du monomère en présence de concentrations croissantes de Ni^{2+} . 50 nM de plasmide pDT10 ont été incubés avec 20 μM de monomère.

Afin de pouvoir comparer quantitativement la liaison du dimère et du monomère sur l'ADN, une analyse par anisotropie de fluorescence a été entreprise.

VI.2 Etude des interactions protéines / ADN par anisotropie de fluorescence

Il est possible de suivre la fixation d'une protéine sur une séquence oligonucléotidique marquée avec une sonde fluorescente en suivant l'anisotropie de fluorescence de cette sonde. Pour notre étude, nous avons choisi d'utiliser un oligonucléotide contenant la boîte FUR consensus de 19pb. Cette séquence a été décrite comme nécessaire et suffisante pour une répression par FUR. Les 19pb sont entourées de deux triplets de paires de base GC afin de défavoriser la formation d'épingle à cheveux au profit de dimère. Le fluorophore (F), dans notre cas une fluorescéine, est fixé (commercial) à l'extrémité 5' d'un des brins.



L'anisotropie de fluorescence consiste à exciter le fluorophore par des photons **polarisés** verticalement et de longueur d'onde ν telle que la différence entre les niveaux d'énergie soit $E_{S1} - E_{S0} = h\nu_1 = h/\lambda_1$ (Figure VI.5A et B). Pour retourner à l'équilibre, après des conversions électroniques internes, le fluorophore va émettre des photons de longueur d'onde $h\nu_2$ ($\nu_2 = 1/\lambda_2$).

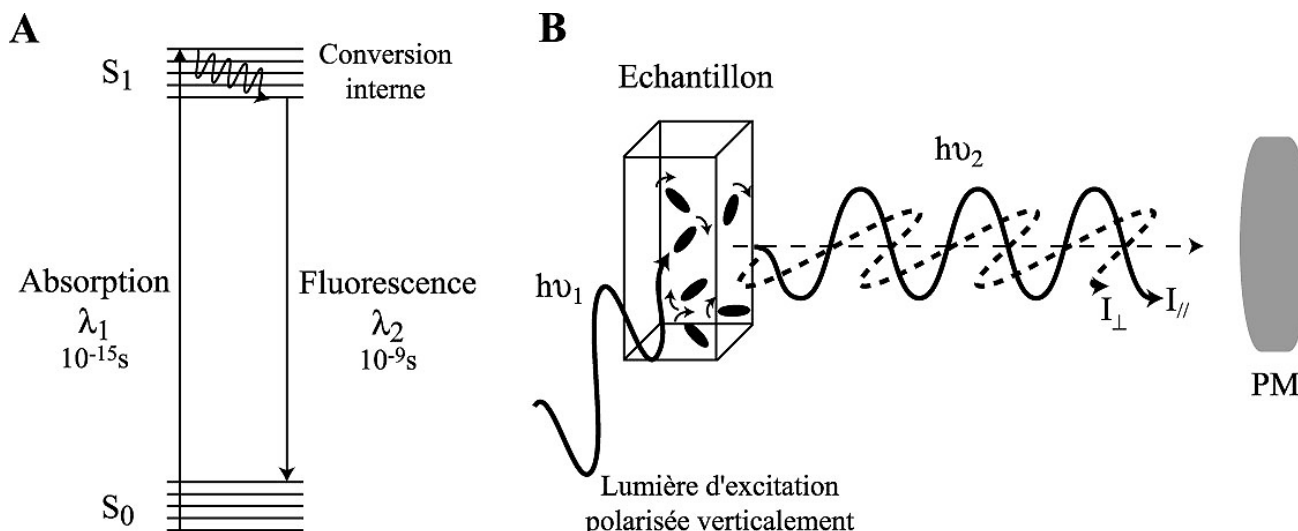


Figure VI.5 : Principe de l'anisotropie de fluorescence. PM : photomultiplicateur.

Les photons émis auront une polarisation différente du faisceau de photons incident du fait de la rotation de la molécule (Figure VI.5B). L'anisotropie de fluorescence « r » correspond au degré de polarisation des photons émis. Pour cela on utilise la relation suivante :

$$r = \frac{I_{//} - GI_{\perp}}{I_{//} + 2GI_{\perp}}$$

Le facteur de correction G permet de tenir compte des imperfections de l'appareil qui n'a pas la même sensibilité selon la direction de la polarisation mesurée.

D'autre part, l'anisotropie de fluorescence est sensible à la rotation de la molécule et augmente proportionnellement avec le temps de corrélation τ_c de la molécule fluorescente comme le montre l'équation de Perrin :

$$r = \frac{r_0}{1 + t/\tau_c} \quad \text{où } r_0 \text{ correspond à l'anisotropie limite (dont la valeur dépend de l'angle entre le dipôle}$$

d'absorption et d'émission) et t correspond au temps de demi vie du fluorophore. Plus le temps de corrélation est long (traduisant une rotation plus lente du fait d'une augmentation de masse et/ou de volume) plus l'anisotropie augmente. Le choix de la sonde est très important car la durée de demi-vie t du fluorophore influence directement le signal observé. Pour voir un effet lors de la formation d'un complexe, la durée de demi-vie doit être de l'ordre du temps de corrélation du complexe observé.

Cette technique permet donc suivre la fixation d'une protéine sur une séquence oligonucléotidique marquée avec une sonde fluorescente par anisotropie de fluorescence. Dans les expériences suivantes, l'ADN utilisé est marqué avec une fluorescéine (notée **F**) dont la durée de demi-vie est de 4 ns.

Ces expériences sont réalisées en présence d'ADN compétiteur de type poly-dIdC afin de ne pas visualiser les interactions non spécifiques de FUR avec l'ADN.

VI.2.1.1 Comparaison de l'affinité du dimère et du monomère pour l'ADN

Pour cette étude, le Mn^{2+} a été choisi comme métal activateur au lieu du Zn^{2+} . En effet, la titration suivie par anisotropie de fluorescence de 10 nM d'ADN correspondant à la séquence consensus de liaison à l'ADN de FUR d'*E.coli* en présence de 200 μM de Mn^{2+} permet d'obtenir une courbe quantitative de liaison à l'ADN (Figure VI.6). Par contre, la même expérience réalisée en présence de 200 μM de Zn^{2+} montre une anisotropie de fluorescence bien plus importante que celle obtenue avec le Mn^{2+} . Cette augmentation ne correspond pas à une liaison spécifique mais est due soit à la précipitation de la protéine qui modifie la viscosité du milieu soit à la fixation d'oligomères (dont la formation est médiée par le Zn^{2+}) sur l'ADN.

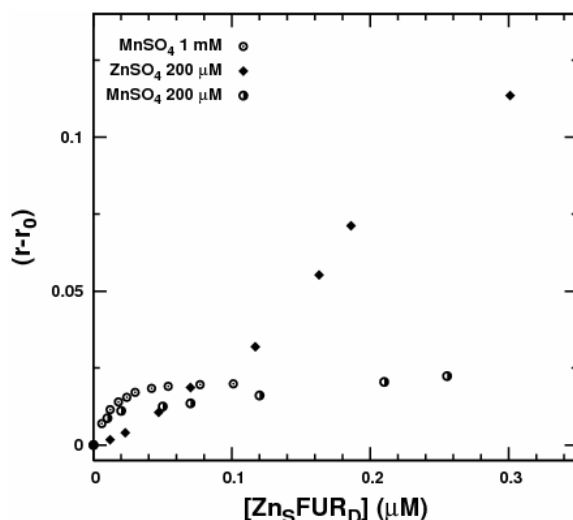


Figure VI.6 : Titration en anisotropie de fluorescence de 10 nM d'un oligomère de 25 paires de bases contenant la séquence consensus de liaison à l'ADN de FUR dans le tampon MOPS 20 mM KCl 150 mM pH 7 en présence de quantités croissantes de Zn_5FUR_D .

On peut remarquer le comportement différent des échantillons en début de titration. Le Mn^{2+} semble être un meilleur activateur que le Zn^{2+} , l'augmentation d'anisotropie de fluorescence en présence de Zn^{2+} est retardée par rapport aux expériences avec le Mn^{2+} .

Des titrations par le métal en présence de quantités fixes de protéines ainsi que des titrations par la protéine en présence d'excès de métal ont été réalisées, car elles apportent des informations complémentaires.

La titration de 10 nM d'ADN consensus en présence d'une concentration fixe de FUR monomère ou dimère par une solution de MnSO_4 montre clairement une différence d'affinité de fixation entre ces deux formes (Figure VI.7). Le K_d observé n'est qu'apparent. En absence de modèle décrivant le mode de fixation du métal à la protéine et de la protéine contenant le métal à l'ADN, le K_d apparent peut être décrit par :

$$K_{dapp} = K_d^{\text{Mn}^{2+}} * K_d^{\text{ADN}}$$

En absence de modèle connu pour décrire la liaison de la protéine au métal et à l'ADN, les données peuvent être ajustées avec l'équation de Hill modifiée qui prend la forme suivante :

$$r = r_{\text{libre}} + (r_{\text{lié}} - r_{\text{libre}}) \frac{(C / K_d)^n}{1 + (C / K_d)^n}$$

où C est la concentration totale de l'espèce titrante, r_{libre} est l'anisotropie de l'ADN 100% libre et $r_{\text{lié}}$ l'anisotropie de l'ADN 100% lié et n est le coefficient de Hill qui rend compte de l'existence ou non de coopérativité.

Ainsi on trouve que la constante de dissociation apparente du dimère pour l'ADN est $K_{\text{dapp}}^{\text{Dim}} = 5.7 \pm 0.4 \mu\text{M}$ avec n de 2.9 ± 0.1 . Celle du monomère est de $K_{\text{dapp}}^{\text{Mono}} \approx 154 \pm 7 \mu\text{M}$ avec n de 3.7 ± 0.3 dans ces conditions. Il y a donc un facteur de 25 de différence entre les K_{dapp} suggérant une moins bonne affinité du monomère pour le métal ou du monomère métallé pour l'ADN comparé au dimère.

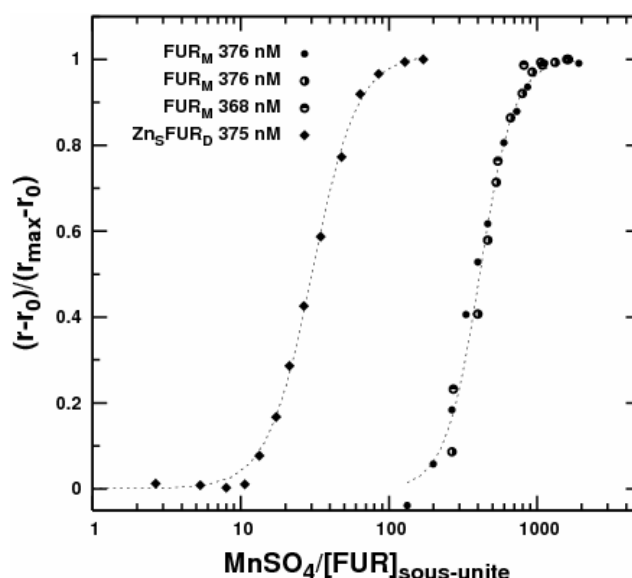


Figure VI.7 : Titration de 10 nM d'ADN consensus en présence d'une concentration fixe de monomère ou de dimère dans MOPS 20 mM KCl 125 mM poly-dIdC 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ MgSO_4 12 mM pH 7 par une concentration croissante de MnSO_4 . Le rapport Mn / FUR est exprimé par rapport à une sous-unité de FUR. Les courbes pointillées correspondent aux ajustements obtenus avec l'équation de Hill.

La titration « réciproque » (Figure VI.8), à savoir la titration de 10 nM d'ADN consensus en présence d'une concentration fixe de MnSO_4 (1 mM) montre également une différence d'affinité pour l'ADN. Tout d'abord il faut noter que aussi pour le dimère que pour le monomère on observe une liaison à l'ADN qui dépend de la présence de manganèse (Figure VI.8).

Dans ces expériences, l'affinité du dimère ($K_{dapp}^{Dim} \approx 40/2 \approx 20 \text{ nM}$) pour l'ADN est 5 fois supérieure à celle du monomère ($K_{dapp}^{Mono} \approx 100 \text{ nM}$). Les coefficients de Hill trouvés sont respectivement de $1,6 \pm 0,1$ et $2,3 \pm 0,1$.

Le fait que le rapport entre les deux expériences ne soit pas le même est dû au fait que lors de la titration de l'ADN en présence de 1 mM de MnSO_4 (Figure VI.8), la proportion de protéine ayant incorporé le métal est bien plus grande et non limitante comparé à la titration à concentration de métal variable (Figure VI.7). En effet, si l'on considère que le K_{dapp} de fixation du Mn^{2+} est de $80 \mu\text{M}$ (7, 16) et que le modèle de liaison simple du métal à la protéine est de type $A+B \rightarrow AB$, la proportion de protéine ayant incorporé le métal dans ces conditions est de plus de 90% et ne sera donc pas limitante (Figure VI.9A). Lors de la titration en métal, la proportion de protéine ayant incorporé le métal est limitée par la concentration en métal dans la solution. Celle-ci augmentera au cours de l'expérience comme simulée en Figure VI.9B si l'on considère le même modèle simpliste défini plus haut. Ceci indique donc que l'affinité pour le métal est bien plus faible que celle de la protéine métallée pour l'ADN.

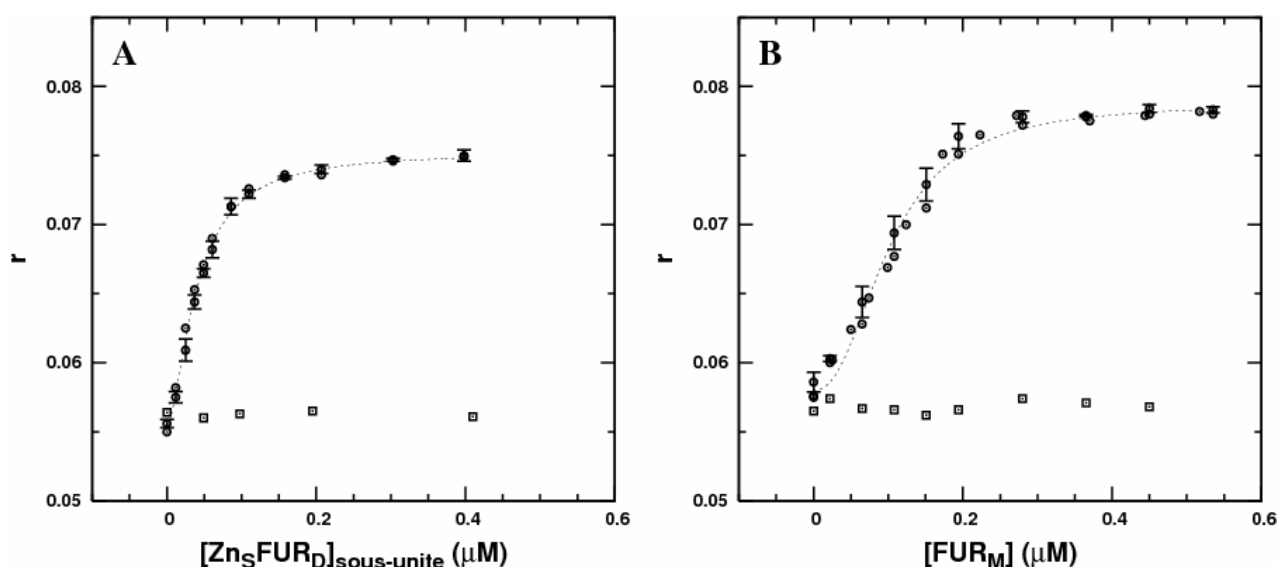


Figure VI.8 : Titration par anisotropie de fluorescence de 10 nM d'ADN consensus dans MOPS 20 mM KCl 125 mM poly-dIdC $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ MgSO_4 12 mM pH 7 par une concentration croissante de FUR dimère (A) ou monomère (B). Les cercles correspondent aux expériences réalisées en présence de 1 mM de MnSO_4 et les carrés correspondent aux expériences réalisées en absence de MnSO_4 . Les données sont ajustées avec l'équation de Hill (courbe pointillées) afin d'obtenir un K_d apparent. A) K_d apparent de $40 \pm 1 \text{ nM}$ B) K_d apparent de $102 \pm 2 \text{ nM}$.

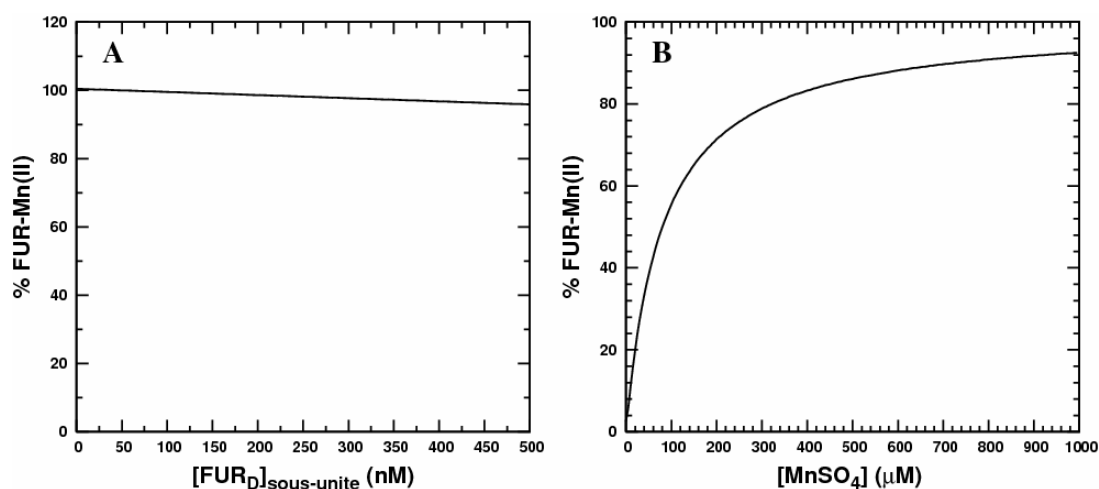


Figure VI.9 : Simulation du pourcentage de complexe FUR-Mn(II) pour un équilibre simple $A+B \rightarrow AB$ en absence de coopérativité et pour des sites identiques. A) Simulation pour une titration en présence de 1 mM de $MnSO_4$ (conditions de l'expérience Figure VI.8A). B) Titration par du $MnSO_4$ pour une concentration constante de 375 nM de Zn_1FUR_D (conditions de l'expérience Figure VI.7)

L'ensemble des résultats est regroupé dans le Tableau 2.

	Titration Mn^{2+}			Titration protéine		
	Kd (μM)	n	R^2	Kd (μM)	n	R^2
Dimère	5.7 ± 0.4	2.9 ± 0.1	0.998	0.020 ± 0.001	1.6 ± 0.1	0.996
monomère	154 ± 7	3.7 ± 0.3	0.985	0.102 ± 0.002	2.3 ± 0.1	0.988

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des paramètres déterminés lors de l'ajustement par l'équation de Hill.

Si l'on compare les courbes de liaisons à l'ADN en présence d'un excès de $MnSO_4$ on s'aperçoit que la variation d'anisotropie entre l'ADN totalement libre et l'ADN totalement lié est identique pour le monomère et le dimère. Ceci suggère que les masses des complexes sont très proches dans les deux cas.

De plus, les ajustements obtenus avec l'équation de Hill indiquent que la formation du complexe protéine/métal/ADN est très probablement coopérative (Tableau 2). Cette coopérativité semble être accentuée dans le cas du monomère par rapport au dimère. Néanmoins, ces expériences ne permettent pas de déterminer quel est l'étape coopérative : l'incorporation du métal, la liaison à l'ADN où les deux ? Néanmoins, si l'on compare les données obtenues pour le monomère et le dimère en présence de 40 μM de Mn^{2+} et pour une concentration identique en sous-unité (~ 400 nM), on observe que 100% du dimère est lié à l'ADN alors que 0% du monomère est lié à l'ADN (Figure VI.7). Ceci suggère que les différences d'affinités observées sont probablement majoritairement dues aux différences d'affinité du monomère et du dimère pour le métal, le dimère ayant la plus forte affinité pour celui-ci.

Il est difficile de simuler nos données avec un modèle défini pour la fixation du dimère et du monomère sur l'ADN en absence de la connaissance sur la stoechiométrie du complexe ADN/protéine et également du modèle de liaison du métal. Comme nous l'avons vu au chapitre I, il existe dans la littérature plusieurs modèles qui ont des stoechiométries différentes allant de 1 à 3 pour l'interaction du dimère de FUR avec l'ADN.

C'est pourquoi, des expériences de mobilité sur gel (EMSA)) avec notre oligonucléotide de 25pb ont été réalisées afin d'obtenir la stoechiométrie précise des complexes dimère/ADN et monomère/ADN.

VI.2.1.2 Détermination de la stoechiométrie protéine/ADN par EMSA

Les expériences EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) selon la méthode de Ferguson, consistent à faire migrer une molécule ou un complexe dans des gels natifs à différents pourcentages d'acrylamide afin d'en déduire leur masse. Le fait d'utiliser des gels de réticulation différente en combinaison avec l'utilisation de protéines marqueurs de poids connu permet de s'affranchir des problèmes de charge de la protéine et de déterminer le poids apparent du complexe (Figure VI.11B). Pour chaque protéine marqueur et pour chaque échantillon à étudier, on obtient un jeu de gels qui permet de calculer le déplacement de l'échantillon dans le gel en fonction du pourcentage du gel.

Pour s'affranchir des différences de temps de migration, ce paramètre est mesuré en calculant le rapport frontal c'est-à-dire le rapport de la distance parcourue par l'échantillon sur la distance parcourue par le tampon. La régression linéaire des distances parcourues en fonction du pourcentage du gel permet d'obtenir une pente caractéristique de la taille (et de la forme) de la molécule. La représentation graphique de ces pentes pour des marqueurs protéiques en fonction de leur poids moléculaire connu (Figure VI.10) permet de déterminer (Figure VI.11B) le poids approximatif des complexes ADN-protéines observés (Figure VI.11A) (18).

Dans ces expériences, réalisées avec l'aide de Julien Viret, de Christelle Caux-Thang et de Rutger Diederix, la même séquence nucléotidique que pour l'anisotropie de fluorescence a été utilisée. Cette méthode a permis de mettre en évidence deux espèces de poids moléculaire 90 et 269 kDa observées à différents rapports Protéine/ADN. Le poids moléculaire apparent de l'ADN seul étant de 30 kDa, le complexe spécifique à 90 kDa serait composé de l'ADN et de deux dimères. Il correspond au seul complexe observé pour des rapports FUR/ADN inférieurs à 30. La seconde forme à 269 kDa est observée pour des rapports molaires FUR_D/ADN plus importants (supérieurs à 30) et correspond vraisemblablement à un complexe aspécifique formé avec de la protéine sous forme d'oligomère.

En ce qui concerne le monomère, une bande identique à celle obtenue pour le complexe dimère/ADN à 90 kDa est observée correspondant à une masse approximative de 90 kDa. Ceci suggère que le complexe monomère/ADN serait constitué de 4 monomères. Aucune bande correspondant à des espèces de plus petit poids moléculaires n'a pu être observée aussi bien pour le monomère que pour le dimère. Ceci suggère l'absence d'espèce ayant des stœchiométrie de 1, 2 ou 3 monomères/ADN ou de 1 dimère/ADN. Cela peut s'expliquer par de la coopérativité dans les deux cas. Ceci suggère que le complexe monomère/ADN serait constitué de 4 monomères.

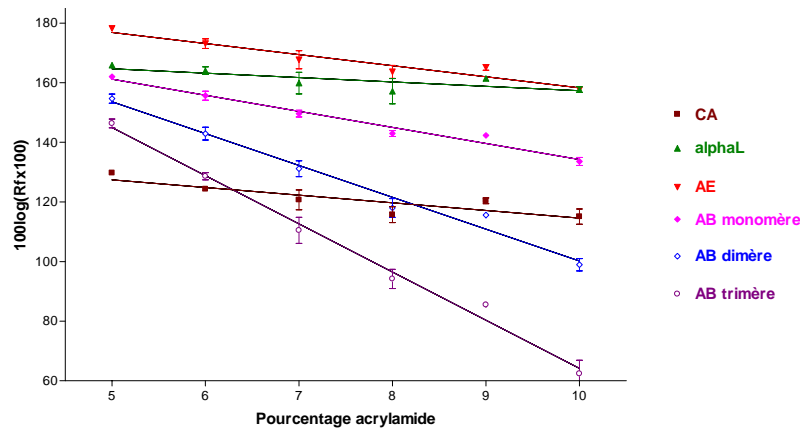


Figure VI.10 : Migration des différents marqueurs en fonction du pourcentage d'acrylamide.

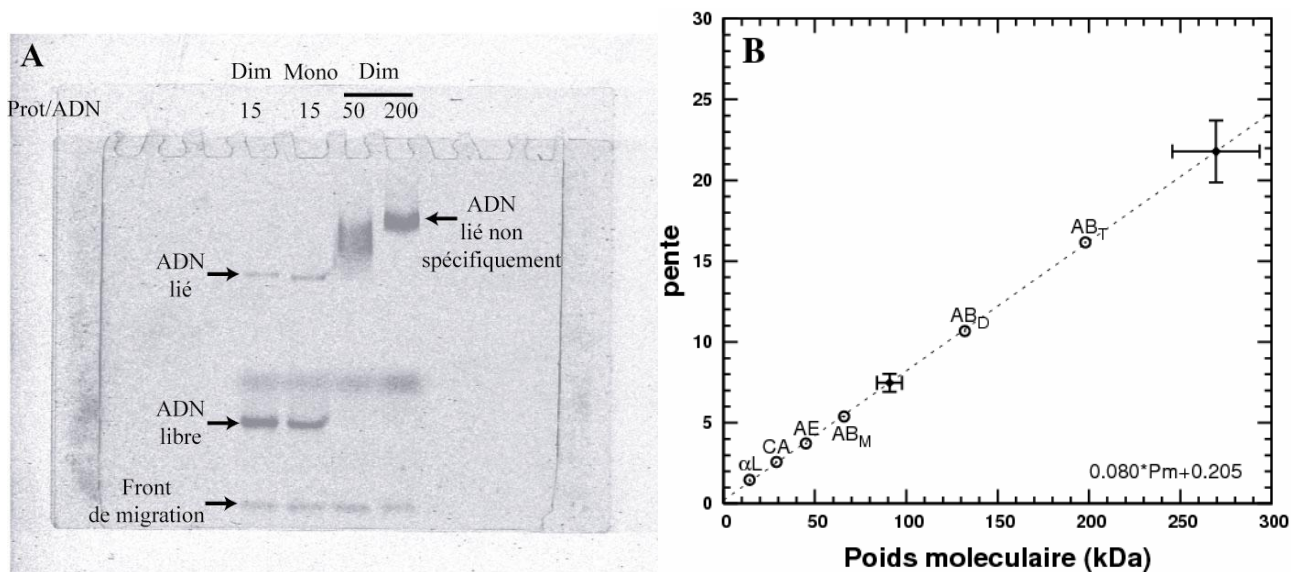


Figure VI.11 : Détermination du poids moléculaire du complexe FUR_D/ADN. A) exemple de gel visualisé par fluorescence montrant la migration de l'ADN. B) Graphique représentant la variation de migration des espèces suivant le % d'acrylamide (pente) en fonction du poids moléculaire des espèces. Les marqueurs utilisés sont l' α -lactalbumine (α L), l'anhydrase carbonique (CA), l'albumine d'œuf (AE) et l'albumine bovine que l'on trouve sous forme monomère (AB_M) dimère (AB_D) et tétramère (AB_T). Les points ♦ avec les barres d'erreurs correspondent aux valeurs de pentes obtenues pour les complexes FUR_D/ADN.

Les données d'anisotropie de fluorescence et l'observation de complexes FUR_M-ADN et FUR_D-ADN de poids moléculaire apparent identiques en EMSA indiquent que le complexe FUR_M-ADN est donc composé de 4 monomères par séquence d'ADN.

L'ensemble des données obtenues à ce stade montre que le monomère est capable de se lier à la séquence consensus de FUR d'*E.coli* en présence de Ni²⁺, de Mn²⁺ et de Zn²⁺. D'autre part, l'anisotropie de fluorescence ainsi que l'EMSA ont montré que le complexe FUR_M-ADN a le même poids moléculaire apparent que le complexe FUR_D-ADN et serait donc constitué de 4 monomères par molécule d'ADN.

Nos résultats sont en accord avec le modèle d'Hermann et *al.* Dans ce modèle, deux dimères peuvent se fixer sur chaque « boîte fur » sur des faces opposées de la double hélice d'ADN (1) comme décrit dans le cas du complexe DtxR/ADN (cf Chapitre I). Ces résultats permettent de restreindre les modèles d'interaction possibles. Rutger Diederix, stagiaire post-doctoral au laboratoire, a aussi réalisé des expériences d'anisotropie de fluorescence sur le dimère de FUR. Il a pu montrer que seul un modèle rendant compte de la stoechiométrie de 2 dimères de FUR/ADN pouvait simuler les résultats expérimentaux obtenus.

Ceci n'explique pas néanmoins, la stoechiométrie de liaison du monomère, la dépendance vis-à-vis du métal et le fait que l'affinité du monomère pour l'ADN ne soit qu'une dizaine de fois inférieure à celle du dimère est également troublant. D'après la RMN, le domaine N terminal du monomère possède toutes les structures secondaires observées dans la structure de la forme ayant incorporé du zinc dans le site régulateur de *P.aeruginosa* dont l'hélice $\alpha 1$. Sa liaison à l'ADN devrait donc être indépendante du métal en l'absence d'autres mécanismes de régulation. Or l'anisotropie de fluorescence indique clairement que la liaison à l'ADN n'est observée qu'en présence de métal. On aurait pu penser que l'ion métallique servait uniquement à restructurer le domaine C-terminal stériquement gênant, mais l'étude RMN a montré que seuls de très faibles changements structuraux se produisaient lors de la métallation du monomère.

Il est donc probable que d'autres événements surviennent lors de l'incorporation du métal par le monomère comme par exemple une dimérisation sur l'ADN afin de stabiliser le complexe monomère/ADN. Cette dimérisation serait due au domaine C terminal. En effet, il existe des cas où la dimérisation se fait sur l'ADN comme par exemple avec les domaines de liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires de stéroïde (12). La dimérisation sur l'ADN a aussi été montrée comme un passage possible pour des facteurs de transcription de type leucine ou hélice-boucle-hélice zippé (10).

On peut faire l'hypothèse que le site à zinc présent dans le dimère stabilise une conformation de chaque sous-unité permettant une forte interaction à l'interface et la formation entre autre du feuillet $\beta 5$. Cette conformation très défavorisée en absence de zinc serait rendue possible par l'interaction avec l'ADN permettant de former sur l'ADN un dimère dépourvu de site à zinc structural.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons choisi de produire et d'étudier une forme tronquée de la protéine FUR d'*E.coli* contenant uniquement le domaine de liaison à l'ADN, soit les 82 premiers résidus (coupure à la glutamine 83). Cette forme tronquée sera appelé FUR₁₋₈₂ dans la suite du manuscrit. Nous pourrons ainsi comparer les propriétés de liaison à l'ADN du domaine N-terminal isolé par rapport à celles du monomère et du dimère. Cette protéine incapable de dimériser peut-elle se fixer à l'ADN avec une bonne affinité ?

VI.3 Etude de la protéine tronquée FUR₁₋₈₂

La coupure choisie se situe au niveau de la glutamine 83 qui appartient à une boucle. Dans ce cas, la protéine tronquée contient tous les résidus du domaine N terminal et correspond au domaine de liaison à l'ADN dans sa totalité. L'obtention de la construction du gène codant pour cette protéine est décrite dans les matériels et méthodes.

VI.3.1 Etude de la liaison à l'ADN

Nous avons commencé par étudier l'activité de liaison de FUR₁₋₈₂ avec la séquence d'ADN consensus afin de comparer les résultats obtenus avec ceux du dimère et du monomère. L'anisotropie de fluorescence a été réalisée exactement dans les mêmes conditions que pour le dimère et le monomère, à savoir : titration de 10 nM d'ADN consensus en présence ou non de 1 mM de MnSO₄ dans du tampon MOPS 20 mM KCl 125 mM MgSO₄ 12 mM dIdC 10 µg.mL⁻¹ pH 7. Les résultats obtenus sont intéressants. L'anisotropie de fluorescence montre un comportement clairement différent de FUR₁₋₈₂ par rapport au dimère et au monomère de FUR vis-à-vis de la liaison à l'ADN. Alors que ces derniers se lient à l'ADN avec un K_d apparent de l'ordre de la dizaine à la centaine de nanomolaires, aucune liaison n'est observée avec FUR₁₋₈₂ pour des rapports protéine/ADN allant jusqu'à ~1250 (Figure VI.12). On peut également remarquer que la présence ou non de métal ne change rien vis-à-vis de la liaison à l'ADN. Dans ces conditions, le K_d_{app} est supérieur à 10 µM en présence d'ADN compétiteur.

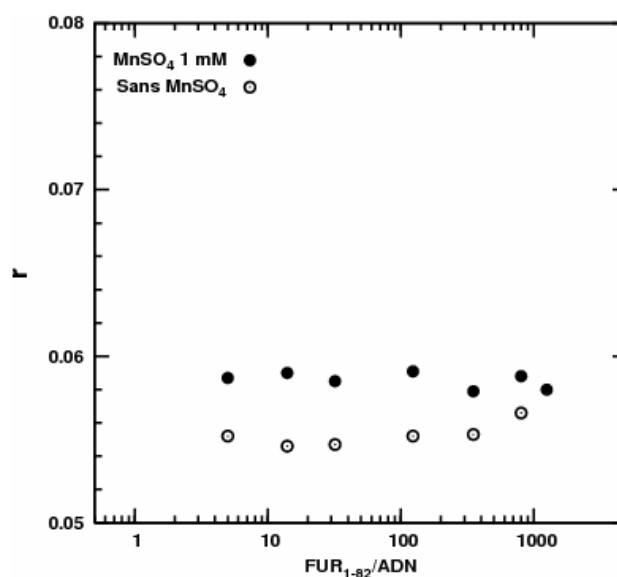


Figure VI.12 : Titration de 10 nM d'ADN consensus par des concentrations croissantes de FUR₁₋₈₂ dans du tampon MOPS 20 mM KCl 125 mM MgSO₄ 12 mM dIdC 10 µg.mL⁻¹ pH 7 en présence ou non de 1 mM de MgSO₄ 1 mM.

Afin d'obtenir des excès plus importants de protéine par rapport à l'ADN, ce qui n'était pas possible avec les expériences d'anisotropie qui nécessitent de grandes quantités de protéines (volume de réaction de 2 mL), nous avons réalisé un test d'activité de protection à la coupure par HinfI (volume de réaction 10 µL). Dans cette expérience, 50 nM de plasmide contenant la boîte FUR de l'aérobactine sont mis en présence de 20 à 600 µM de FUR₁₋₈₂ avec ou sans 1 mM de MnSO₄ (Figure VI.13). Ceci correspond à des excès de 600 à 12 000 en protéine. Les pistes 2 et 12 montrent que le Mn²⁺ à 1 mM inhibe totalement l'activité de HinfI, le plasmide n'est plus coupé. Néanmoins, en présence de FUR₁₋₈₂, on observe un retard de la migration du plasmide qui pourrait être dû à la liaison de la protéine sur le plasmide. En absence de Mn²⁺, l'enzyme HinfI coupe bien le plasmide. On observe alors une augmentation de l'intensité de la bande correspondant au fragment d'ADN protégé ce qui suggère que FUR₁₋₈₂ se lie bien au promoteur. On peut estimer, dans ces conditions, un K_d de l'ordre de 300 µM, 2700 fois plus élevé que celui du monomère. Une constante de dissociation apparente dans cet ordre de grandeur correspond probablement à une fixation aspécifique. D'autre part, le fait d'observer un retard de migration de l'ADN suggère que beaucoup de molécules de FUR₁₋₈₂ lient l'ADN alors que la boîte aérobactine ne possède que deux « iron-box ». Ceci va plus dans le sens d'une liaison non-spécifique.

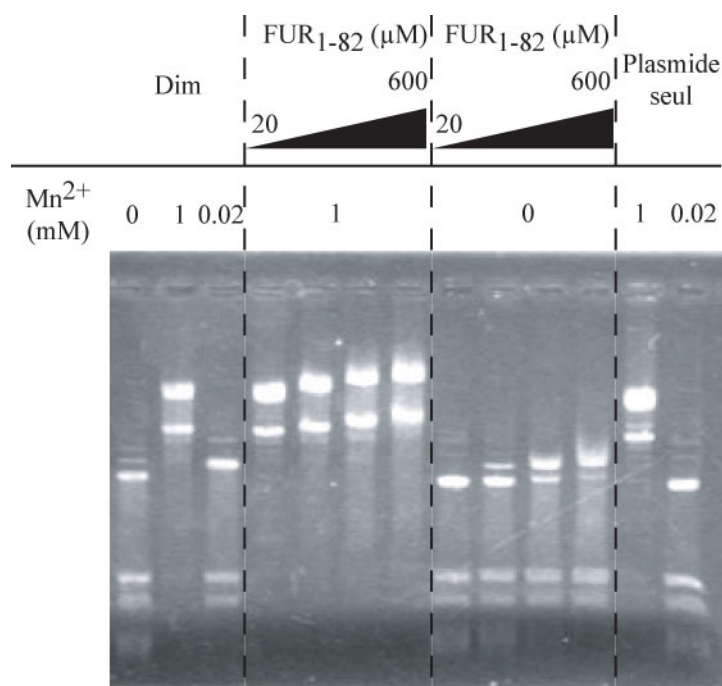


Figure VI.13 : Test d'activité de protection à la coupure par *HinfI* de FUR₁₋₈₂.

Cette expérience ne permet pas de déterminer si la liaison à l'ADN observée est spécifique ou non. Une expérience de type EMSA (du même type que celles réalisées pour le dimère et le monomère) aurait permis de le déterminer. Cette expérience n'a pas encore pu être réalisée du fait de problèmes de maintenance du fluorimager. Néanmoins, le fait d'observer un retard de plus en plus important lorsque la concentration en FUR₁₋₈₂ augmente aussi bien en présence de Mn²⁺ (plasmide non digéré) qu'en absence de métal (plasmide digéré) suggère que la liaison observée n'est probablement pas dépendante du métal.

Afin d'être sûr que ce résultat était significatif, il fallait prouver que la protéine FUR₁₋₈₂ est bien structurée en motif hélicé-coude-hélice-ailé. Pour cela, nous avons réalisé dans un premier temps un spectre 1D ¹H. Ce spectre montrait une bonne dispersion des résonances des protons amides ce qui suggère que la protéine est bien structurée. Afin de pouvoir comparer avec le monomère, un échantillon marqué à l'azote 15 a ensuite été préparé.

VI.3.2 Etude de la forme tronquée FUR₁₋₈₂ par RMN

Le spectre ¹H-¹⁵N HSQC de FUR₁₋₈₂ est donné en Figure VI.14. Le spectre montre une très bonne dispersion des résonances et confirme la bonne structuration de la protéine. La superposition des spectres de FUR₁₋₈₂ avec celui du monomère indique clairement que les structures des deux protéines sont très proches puisque la majorité des résonances se superposent (Figure VI.15). De ce fait, l'attribution des résonances de FUR₁₋₈₂ a été faite à partir de l'HSQC et de l'attribution du monomère.

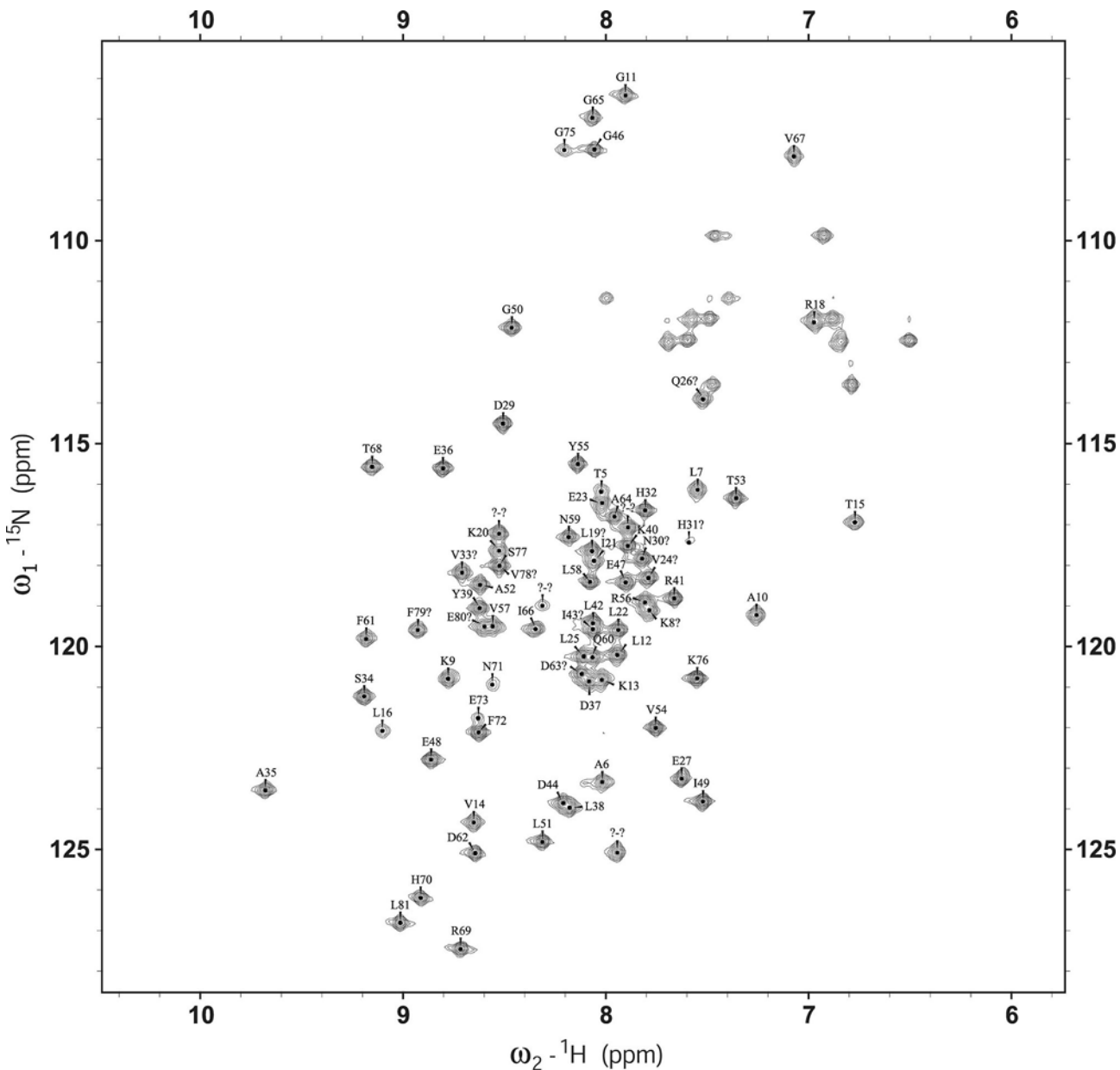


Figure VI.14 : Spectre ^1H - ^{15}N HSQC enregistré à 600 MHz de FUR₁₋₈₂ à 1.8 mM dans MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7.5 avec l'attribution déduite de l'attribution du monomère.

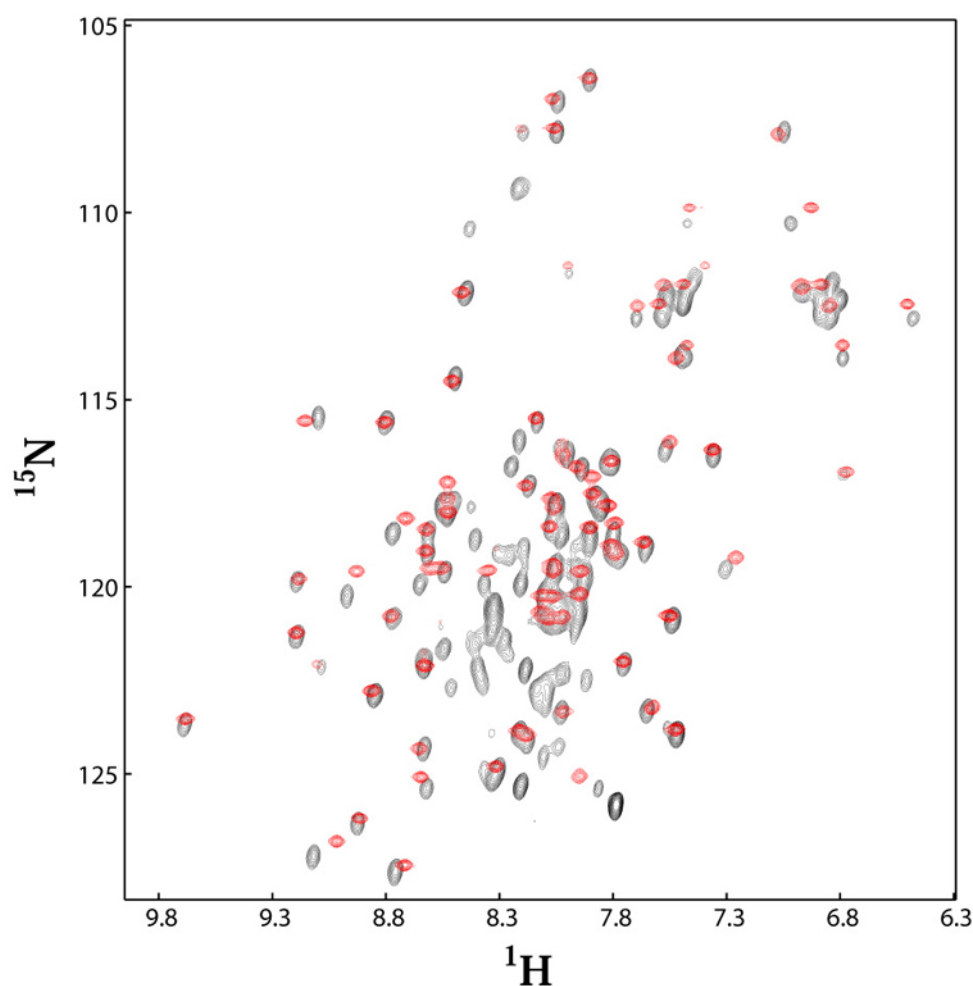


Figure VI.15 : Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC enregistrés à 600 MHz du monomère (noir) et de FUR₁₋₈₂ (rouge).

La protéine FUR₁₋₈₂ possède donc une structure secondaire et tertiaire comparable à celle du domaine N-terminal du monomère avec la présence de l'hélice $\alpha 1$. Cependant il était intéressant de savoir si cette structure tertiaire était proche ou non de celle du domaine N-terminal de la forme métallée de FUR de *Pseudomonas aeruginosa*.

Ne disposant plus du temps nécessaire pour résoudre la structure de la forme tronquée par RMN, nous avons essayé de cristalliser la protéine et réussi à obtenir sa structure cristallographique.

VI.3.3 Structure cristallographique de FUR₁₋₈₂

Ce travail a pu être réalisé en collaboration avec Lilian Jacquamet *et al.* (LCCP à l'IBS, Grenoble).

L'utilisation d'un robot de cristallisation a permis de tester 288 conditions simultanément. Parmi ces tests, des cristaux ont été observés dans les conditions :

- Acétate de sodium 100 mM PEG 300 30% (v/v) pH 4.6

- Acétate de sodium 100 mM PEG 400 30% (v/v) pH 4.6 CdCl₂ 100 mM
- MES 100 mM PEG 8000 25% (v/v) pH 6.5 (cristallisation plus lente)

Les conditions de cristallisations ont été affinées et des cristaux de bonne qualité ont été obtenus dans les conditions :

- Acétate de sodium 100 mM PEG 200 30% (v/v) pH 4.6 CdCl₂ 100 mM

Ces cristaux ont permis d'enregistrer des clichés de diffraction avec une résolution de 1.4 Å en début de collection et de 1.8 Å en fin de collection. La structure a été résolue à 1.8 Å par remplacement moléculaire d'après la structure cristallographique de FUR de *Pseudomonas aeruginosa* qui a 57% d'identité de séquence avec FUR d'*E.coli*. Tous les acides aminés non conservés du modèle ont été mutés par les acides aminés de FUR₁₋₈₂. La structure a été calculée à l'aide de plusieurs programmes, la démarche suivie est expliquée dans la section Matériel et Méthode.

La protéine cristallise dans un groupe d'espace P2₁2₁2 dont les paramètres de maille sont a = 38.50 Å, b = 159.27 Å, c = 28.65 Å. L'unité asymétrique est constituée de 2 molécules avec un taux de solvant de 48%. Le dimère observé est vraisemblablement un artefact de cristallisation. En effet, l'hélice d'interaction avec l'ADN est impliquée dans l'interface de dimérisation et ne peut être disponible pour interagir avec l'ADN dans ces conditions. L'interface de dimérisation est composée de deux atomes de cadmium qui sont coordonnés par l'Asp 63 d'un monomère et l'Asp 64 de l'autre monomère, de deux liaisons hydrogènes inter sous-unité impliquant l'azote ND2 de l'Asn 72 d'un monomère avec l'OD1 de l'Asn 60 de l'autre monomère et de deux contacts Van der Waals entre l'Ala 53 d'une sous-unité et la Phe 73 de l'autre sous-unité.

Resolution (Å) ¹	50-1.7 (2.28-2.2)
Groupe d'espace	P2 ₁ 2 ₁ 2
Unité asymétrique	a=38.5 Å; b= 159.1 Å; c=28.6 Å.
Nombre de réflexions	97738
Nombre de réflexions uniques	20036
Rsym (%) ¹	7.9 (33.3)
Complétude (%) ¹	98.7 (97.7)
I/σ(I)	13.89 (4.69)
Redondance	4.9
Résolution (Å)	28-1.7
R (%)	19.8
R _{free} (%)	22.6
R.m.s.d. bonds (Å)	0.012
R.m.s.d. angles (°)	1.3

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des paramètres cristallographiques et de la qualité de la structure.

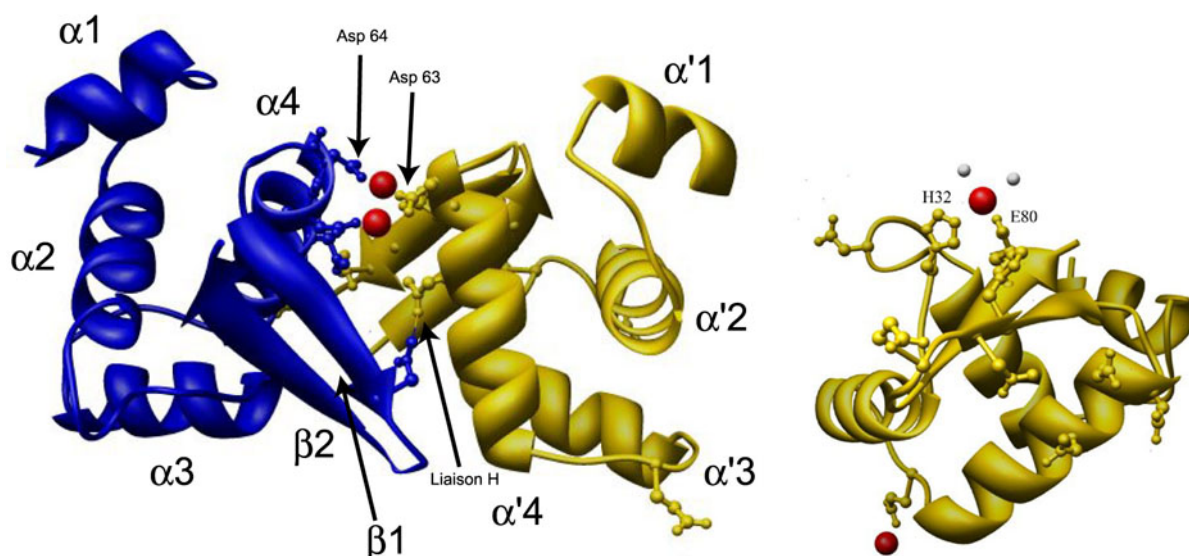


Figure VI.16 : A gauche, structure du dimère de FUR₁₋₈₂ obtenu par cristallographie. Les Cd²⁺ impliqués dans la stabilisation du dimère sont représentés en rouge. A droite, un cadmium est coordonné par les résidus H32 et E80, résidus impliqués dans la coordination du Zn(II) dans le site structural de FUR de *P.aeruginosa*.

FUR₁₋₈₂ est donc composée de 4 hélices α (3-9, 16-25, 35-44, 51-63) et d'un feuillet β antiparallèle composé des résidus 67-72 (β 1) et 77-81 (β 2) (Figure VI.16). Ceci confirme les données RMN obtenues sur le monomère de FUR d'*E.coli*. La comparaison des structures secondaires du monomère et de FUR₁₋₈₂ respectivement déterminées par RMN et par cristallographie montre que ces structures sont quasiment identiques ce qui confirme l'attribution par RMN (Figure VI.17). L'hélice α 2 comporte un résidu de plus à chaque extrémité dans FUR₁₋₈₂, de même que le brin β 2 est décalé d'un résidu. Ces différences ne sont pas significatives et sont dues probablement à l'imprécision de la détermination des structures secondaires par RMN. La présence de Cd²⁺ dans la structure de FUR₁₋₈₂ chélaté par les chaînes latérales des résidus H32 et E80 est intéressante car elle indique que les chaînes latérales de ces deux résidus sont naturellement des ligands d'ions divalents dans la protéine.



Figure VI.17 : Comparaison des structures secondaires déterminées pour le monomère par RMN et pour FUR₁₋₈₂ par cristallographie.

La comparaison des structures cristallographiques de FUR de *Pseudomonas aeruginosa* et de FUR₁₋₈₂ montre que les structures sont très proches (Figure VI.18). La déviation moyenne obtenue sur 77 C α est de 1 Å. Toutes les hélices α du domaine N terminal sont superposables de même que le feuillet β 1/ β 2. Les seules différences observables sont localisées au niveau des boucles. Il est également très intéressant de noter qu'un atome de Cd²⁺ est coordonné par les résidus H32 et E80 et deux molécules de solvant. Ce Cd²⁺ est lié à deux ligands normalement impliqués dans le site structural à Zn(II) observé dans la structure de *P.aeruginosa* FUR.

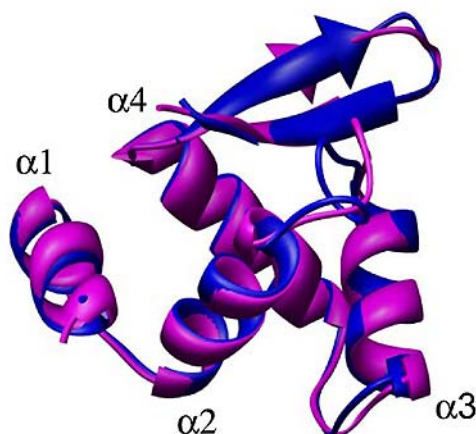


Figure VI.18 : Superposition des structures cristallographiques de FUR de FUR₁₋₈₂ (bleue) et de *Pseudomonas aeruginosa* (magenta). Les chaînes principales sont représentées sous forme de ruban.

Il est intéressant de noter qu'en absence du domaine C-terminal, le domaine N-terminal seul de FUR d'*E.coli* possède le même repliement que le domaine N terminal de FUR de *Pseudomonas aeruginosa*. Le domaine N-terminal de FUR d'*E.coli* correspond donc à une unité de repliement indépendante et le domaine C-terminal ne joue *a priori* aucun rôle dans la structure de ce domaine.

Malgré ces résultats, la liaison métal-dépendante du monomère à l'ADN reste incomprise. La différence entre le monomère et FUR₁₋₈₂ étant la présence du domaine C terminal dans le monomère, on peut se poser des questions sur son importance dans la liaison du monomère à l'ADN et l'importance de la liaison du métal. Cela ramène à l'hypothèse d'une dimérisation possible du monomère de FUR_{Mox} sur l'ADN.

Afin de tester cette hypothèse, des expériences de pontage à l'EDC ont été débutées. En effet, nous savons que le dimère de FUR peut-être ponté par l'EDC avec de très bon rendement (visible sur gel SDS-PAGE) contrairement au monomère. Nous avons voulu voir si en présence d'ADN on observait un pontage du monomère oxydé. Des résultats préliminaires montrent que l'on observe bien la formation d'une espèce dimérique pontée lors de la réaction du monomère oxydé avec l'EDC en présence d'ADN. Ceci renforce l'hypothèse de la dimérisation de FUR_{Mox} sur l'ADN.

VI.4 Discussion

L'ensemble de ce travail a permis d'apporter plusieurs informations importantes quant à la liaison de FUR_{Mox}, FUR₁₋₈₂ et FUR_D sur la boîte FUR consensus.

Le dimère et le monomère de FUR d'*E.coli* lient spécifiquement la boîte FUR consensus avec des $K_{d_{app}}$ de l'ordre de la vingtaine de nM pour le dimère et de la centaine de nM pour le monomère. Cette liaison à l'ADN dépend de la présence d'ions métalliques dans les deux cas. Ce n'est pas le cas de FUR₁₋₈₂ qui se lie avec une très mauvaise affinité et de façon indépendante du métal. Une constante de dissociation apparente de l'ordre de $K_{d_{app}} \approx 300 \mu M$ peut être estimée.

Les analyses EMSA par la méthode de Ferguson ont montré que les complexes Dimère/ADN, Monomère/ADN étaient de tailles comparables suggérant des stœchiométries de 2 dimères/ADN et de 4 monomères/ADN. Bien qu'incapable de se lier fortement à l'ADN FUR₁₋₈₂ a une structure tertiaire classique de motif hélice-coude-hélice ailé superposable à celui du domaine N-terminal de FUR de *Pseudomonas aeruginosa*. La structure cristallographique et les données de RMN confirment aussi la présence de $\alpha 1$ dans le monomère. Une différence importante entre le dimère et le monomère est donc bien la présence de $\alpha 1$ et la structuration moins importante du domaine C-terminal dans le monomère.

Le fait que FUR₁₋₈₂ ne lie pas l'ADN et que le monomère lie l'ADN de manière métal dépendante indique que le domaine C ter qui correspond au domaine de dimérisation et de liaison des métaux est indispensable pour une reconnaissance de l'ADN avec une affinité de liaison dans la gamme des nanomolaires.

La nécessité du domaine C-terminal et de métal pose la question d'une probable dimérisation sur l'ADN du monomère (19). Cette dimérisation serait favorisée par l'ADN comme le suggère les résultats préliminaires de crosslink qu'il sera intéressant de confirmer.

Nous avons montré durant cette thèse que le dimère peut être dissocié en monomère en présence d'un oxydant comme H₂O₂ ou le diamide (oxydant spécifique des thiols) (données non montrées). De nombreux FUR-like tels que FurA, FurS...sont décrits comme des senseurs du stress oxydant. D'autre part, FUR joue un rôle dans la réponse au stress oxydant puisqu'elle contrôle l'expression de deux superoxide dismutase, l'une à fer (régulée positivement) 3 et l'autre à manganèse (régulée négativement) 8. On peut donc supposer que le passage dimère vers monomère en conditions de stress oxydant pourrait être un nouveau mode de régulation, jamais décrit jusque là, de la protéine FUR. D'autre part, l'affinité apparente moins forte du monomère pour l'ADN par rapport au dimère pourrait être un autre moyen de contrôler finement l'expression des gènes. Nous discuterons plus ces aspects dans le chapitre qui suit.

Références bibliographiques

1. Baichoo N, Helmann JD. 2002. Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* 184: 5826
2. D'Autréaux B. 2002. *Etudes spectroscopiques de la protéine FUR (Ferric Uptake Regulation). Interaction avec le monoxyde d'azote*. Scientific thesis. UJF, Grenoble
3. Dukan S, Touati D. 1996. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *J Bacteriol* 178: 6145
4. Gonzalez de Peredo A, Saint-Pierre C, Latour JM, Michaud-Soret I, Forest E. 2001. Conformational changes of the ferric uptake regulation protein upon metal activation and DNA binding; first evidence of structural homologies with the diphtheria toxin repressor. *J Mol Biol* 310: 83
5. Hamed MY. 1993. Binding of the ferric uptake regulation repressor protein (Fur) to Mn(II), Fe(II), Co(II), and Cu(II) ions as co-repressors: electronic absorption, equilibrium, and ⁵⁷Fe Mossbauer studies. *J Inorg Biochem* 50: 193
6. Kohler JJ, Metallo SJ, Schneider TL, Schepartz A. 1999. DNA specificity enhanced by sequential binding of protein monomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11735
7. Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB. 1991. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352: 497
8. Niederhoffer EC, Naranjo CM, Bradley KL, Fee JA. 1990. Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (sodA and sodB) genes by the ferric uptake regulation (fur) locus. *J Bacteriol* 172: 1930
9. Smith A, Hooper NI, Shipulina N, Morgan WT. 1996. Heme binding by a bacterial repressor protein, the gene product of the ferric uptake regulation (fur) gene of *Escherichia coli*. *J Protein Chem* 15: 575
10. Viret J. 2005. *Rapport de BTS : Extraction et Purification de la Protéine Fur (Ferric Uptake Regulator) et analyse du poids moléculaire d'un complexe FUR/ADN*
11. Wong I, Chao KL, Bujalowski W, Lohman TM. 1992. DNA-induced dimerization of the *Escherichia coli* rep helicase. Allosteric effects of single-stranded and duplex DNA. *J Biol Chem* 267: 7596

Chapitre VII

Discussion générale et conclusions

VII.1 Résumé du travail réalisé

Au début de ce travail de thèse, aucune structure tridimensionnelle de la protéine FUR n'était connue. Cette protéine est un régulateur global ubiquitaire essentiel à la viabilité dans les bactéries Gram-négatives. La recrudescence des maladies nosocomiales posant de gros problèmes de santé publique, la protéine FUR représente une cible potentiellement intéressante à l'élaboration de nouveaux antibiotiques. En ce sens, sa structure pourrait donner des indications précieuses quant à son mode d'action et aider à l'élaboration de nouvelles drogues.

Nous avons donc entrepris de résoudre la structure du dimère Zn_5FUR_D d'*E.coli* correspondant à la forme incapable de lier l'ADN. Pour faire ce travail, nous avons d'abord attribué les résonances de la chaîne principale de la protéine ce qui nous a permis de déterminer et de localiser expérimentalement les structures secondaires présentes dans cette protéine. Nous avons ensuite attribué les résonances des chaînes latérales mais ce travail a été très difficile et n'a pas permis d'attribuer plus de 40% des résonances des chaînes latérales. Dans ces conditions, la détermination de la structure de la protéine par les méthodes classiques RMN basées sur l'attribution des NOEs n'était plus possible, le nombre de contraintes disponibles non ambiguës étant trop faible. Nous avons donc essayé une nouvelle approche basée sur la détermination des NOEs entre méthyles, les résidus hydrophobes étant très souvent importants pour le repliement car ils se retrouvent dans le cœur de la protéine. Cette approche a permis d'identifier quelques contacts, mais encore une fois, le nombre de contraintes disponibles était bien trop faible. La structure d'un membre de la famille FUR a alors été résolue par diffraction des rayons X, la protéine FUR cristallisée en excès de Zn^{2+} de *P.aeruginosa* FUR ($Zn_RZn_5FUR_D$) (22). Comme il s'agit *a priori* de la structure de la forme de FUR capable de lier l'ADN et que nous avions jusqu'alors travaillé sur la forme inactive (Zn_5FUR_D), nous avons entrepris d'obtenir des informations structurales permettant de comparer les structures des deux formes afin d'éclaircir le mécanisme d'activation. Dans ce but, nous avons tenté de mesurer les couplages dipolaires résiduels sur Zn_5FUR_D d'*E.coli*. Malheureusement, les propriétés de l'échantillon n'ont, à ce jour, pas permis d'obtenir de mesures fiables pour déterminer l'orientation relative des éléments de structure secondaire de Zn_5FUR_D d'*E.coli* et comparer les structures des formes actives et inactives.

Le travail a donc été réorienté à ce stade. En effet, durant sa purification, une forme monomérique de FUR d'*E.coli* est également obtenue. Des travaux précédents ont montré que le monomère est une forme oxydée de la protéine possédant deux ponts disulfures entre les cystéines C92/C95 et C132/C137 (4). D'autre part, les formes monomériques et dimériques ne sont pas en équilibre thermodynamique (4). Par contre, il a été montré que du dimère peut être reformé à partir du monomère en présence de réducteur et de Zn^{2+} , l'incorporation du métal étant l'élément essentiel à la dimérisation (4). Nous avons donc entrepris de comprendre, d'un point de vue structural, quels événements interviennent lors de la dimérisation de la protéine. Dans ce but, nous avons étudié le passage monomère/dimère, par dichroïsme circulaire et RMN, et

montré que la dimérisation s'accompagnait d'une structuration, indiquant que le monomère est moins structuré que le dimère. L'attribution des résonances de la chaîne principale du monomère par RMN a permis de déterminer les structures secondaires présentes. La comparaison des données RMN obtenues sur le monomère et le dimère montre que les domaines C-terminaux des deux formes sont très différents, le domaine C-terminal du monomère étant clairement moins structuré que celui du dimère. Ces résultats sont tout à fait en accord avec ceux obtenus par dichroïsme circulaire. Par contre, les domaines N-terminaux possèdent des structures secondaires identiques sauf au niveau des premiers résidus (5 à 10) qui sont structurés en hélice α dans le monomère et non structurés dans le dimère. La comparaison des structures secondaires obtenues par RMN avec celles observées sur la structure cristallographique montre que l'hélice α_1 identifiée dans la forme activée de la protéine (structure de *P.aeruginosa*) est bien présente dans le monomère mais absente dans le dimère. Nous avons donc proposé que cette hélice joue un rôle important dans l'activation de la protéine, des données obtenues publiées indiquant que la perte de ces résidus induisait une baisse de spécificité (3). L'observation de cette hélice dans le monomère et dans la structure cristallographique nous a amené à nous poser des questions quant à l'activité du monomère vis-à-vis de la liaison à l'ADN. Des résultats obtenus précédemment (4), avaient montré que le monomère était inactif en présence de Fe(II). Nous avons recommencé une étude avec d'autres métaux (Mn(II), Ni(II)) et avons montré que le monomère est capable de lier l'ADN, mais uniquement en présence de métal. Les résultats obtenus avec le Fe(II) sont donc probablement dus à des problèmes expérimentaux (anaérobiose non stricte durant toute la manipulation). Cette fixation métal-dépendante du monomère sur l'ADN confirme les résultats obtenus par B.D'Autréaux qui avait montré que le monomère était capable de lier des métaux comme le Co(II) et le Fe(II) (4). La comparaison des propriétés de liaisons du dimère et du monomère à l'ADN, par anisotropie de fluorescence, nous a indiqué qu'en excès de métal (Mn(II)), l'affinité apparente du monomère pour l'ADN est 5 fois inférieure à celle du dimère. Par contre, l'affinité du monomère pour l'ADN, lors de la titration avec du métal, est environ 25 fois inférieure à celle du dimère dans les mêmes conditions. Ces résultats montrent qu'il y a des différences d'affinité pour le métal entre les deux formes, le dimère ayant l'affinité la plus forte. Parallèlement, nous avons étudié l'incorporation de Zn(II) dans le dimère et le monomère par RMN. Ces expériences nous ont montré que d'importants changements structuraux interviennent dans le dimère alors que les changements structuraux semblent très localisés dans le monomère.

Enfin, afin de déterminer si le domaine N-terminal est seul capable de se lier à l'ADN, nous avons muté le gène de FUR pour obtenir une forme tronquée appelée FUR₁₋₈₂ correspondant à l'intégralité du domaine N-terminal. La structure cristallographique de FUR₁₋₈₂ a été déterminée et montre une structure superposable à celle du domaine N-terminal de Zn_RZn_SFUR_D de *P. aeruginosa*. L'étude de sa liaison à l'ADN a montré que l'affinité de ce domaine pour l'ADN ne dépend pas du métal et est très inférieure à celle du monomère (et *a fortiori* du dimère). En effet, la constante de dissociation passe de l'ordre de la centaine de nanomolaires à la centaine de micromolaires. La différence entre le monomère et FUR₁₋₈₂ étant l'absence

du domaine C-terminal dans la protéine tronquée, cela démontre l'importance de ce domaine pour la liaison à l'ADN. Nous proposons, pour expliquer les différences d'affinité pour l'ADN, que le monomère pourrait dimériser sur l'ADN. Des premiers résultats de cross-link à l'EDC, obtenus au laboratoire, en présence d'ADN vont d'ailleurs dans ce sens.

Toutes ces données nous permettent donc de proposer un modèle d'activation pour le dimère mais également de proposer une hypothèse quant à l'importance du monomère dans la régulation bien qu'une forme monomérique de FUR n'ait jamais été mise en évidence *in vivo*.

Tout ce travail est en cours de publication, une première publication est donnée en annexe, la seconde est en fin de rédaction. Les deux publications seront très prochainement soumises sous forme de papiers jumelés.

VII.2 Discussion sur les changements structuraux responsables de l'activation du dimère de FUR : rôle de l'hélice $\alpha 1$

Les structures secondaires du dimère Zn_5FUR_D d'*E.coli* et du dimère $Zn_RZn_SFUR_D$ de *P.aeruginosa* sont presque identiques (comparaison données RMN et structure cristallographique). La seule différence observée se situe au niveau de l'hélice $\alpha 1$ absente chez *E.coli* mais présente chez *P.aeruginosa*. De ces données, rien n'indique que les structures tertiaires et quaternaires sont identiques dans les deux formes.

De plus, les données RMN montrent que les structures secondaires du domaine N-terminal sont identiques dans le monomère FUR_M et le dimère Zn_SFUR_D d'*E.coli*, à l'exception de l'hélice $\alpha 1$ qui est présente dans le monomère. D'autre part, les structures secondaires du monomère FUR_M et de la protéine tronquée FUR_{1-82} sont identiques. Le fait que les spectres HSQC $^1H-^{15}N$ soient quasiment superposables suggèrent que les structures tertiaires du monomère et de FUR_{1-82} sont probablement très proches. Enfin, les structures cristallographiques de FUR_{1-82} d'*E.coli* et du domaine N-terminal de $Zn_RZn_SFUR_D$ de *P.aeruginosa* sont superposables.

De toutes ces données, on peut conclure que le domaine N-terminal de FUR est un corps rigide dont le repliement est globalement indépendant du domaine C-terminal excepté au niveau des 10 premiers résidus dans le monomère et le dimère. En effet, la structuration de l'extrémité N-terminale de la protéine en hélice $\alpha 1$ semble dépendre de la forme oligomérique et, comme nous allons le proposer pour le dimère, de la présence ou non de métal dans le site de régulation.

Cette hélice $\alpha 1$ est observée dans les structures de FUR₁₋₈₂, FUR_M et dans la structure du dimère Zn_RZn_SFUR_D de *P.aeruginosa* correspondant vraisemblablement à une forme activée de la protéine. Par contre, elle n'est pas observée dans la forme non activée Zn_SFUR_D de FUR d'*E.coli* où les résidus correspondant sont flexibles d'après la RMN. On peut donc s'interroger sur le rôle de cette hélice dans l'activation ou l'activité de la protéine.

Les données de cross-link à l'EDC obtenues sur Zn_SFUR_D d'*E.coli*, indiquent que l'extrémité N-terminale d'une sous-unité est en interaction ionique avec un résidu appartenant à l'extrémité du domaine C-terminal (8). D'autre part, la RMN montre que cette région de la protéine est très flexible. Des études de pontages réalisées à l'adépidimate de méthyle et à l'acétimidate de méthyle, qui pontent des lysines proches dans l'espace, sur la forme Zn_SFUR_D d'*E.coli*, ont montré que les lysines K76 et K97 d'une sous-unité pouvaient être pontées avec des lysines de l'extrémité N-terminale de l'autre sous-unité (8). Cela indique une distance entre elles de moins de 3 Å. Ces travaux de pontage covalents analysés par spectrométrie de masse suggèrent fortement que l'extrémité N-terminale d'une sous-unité est proche de la région « centrale » (81-100) et de l'extrémité C-terminale de l'autre sous-unité dans la forme Zn_SFUR_D de *E.coli*. On peut donc supposer qu'il existe des interactions rapprochant l'extrémité N-terminale d'une sous-unité avec l'extrémité C-terminale de l'autre sous-unité. Néanmoins ces interactions ne seraient pas « rigide », puisque la RMN indique que les extrémités N-terminale et C-terminale sont tout de même flexibles.

Si l'on regarde la position de l'hélice $\alpha 1$ dans la structure cristallographique de *P.aeruginosa*, de telles interactions n'existent pas. L'hélice $\alpha 1$ d'une sous-unité n'est pas en contact avec l'autre sous-unité, ni au niveau de la région (81-100) ni au niveau de l'extrémité C-terminale. Toutes ces informations vont bien dans le sens que l'orientation et la position des premiers résidus de la forme Zn_SFUR_D sont différentes de celles observées dans la structure cristallographique de Zn_RZn_SFUR_D.

On peut donc proposer que l'incorporation de métal dans le site de régulation va permettre de rompre les interactions entre les résidus N-terminaux d'une sous-unité avec les résidus de la région centrale et de l'extrémité C-terminale de l'autre sous-unité. Alors que ces interactions empêchaient la structuration en hélice des résidus N-terminaux, cette hélice va pouvoir se reformer dans la forme activée de la protéine. Comme le montre la Figure VII.1, un positionnement des résidus N-terminaux dans la région où se trouve Lys76, Lys 97 et le N-ter de l'autre sous-unité semble tout à fait possible puisque cette zone correspond à une sorte de cavité à l'interface des dimères. Ce positionnement expliquerait tout à fait une non-affinité d'une telle forme pour l'ADN.

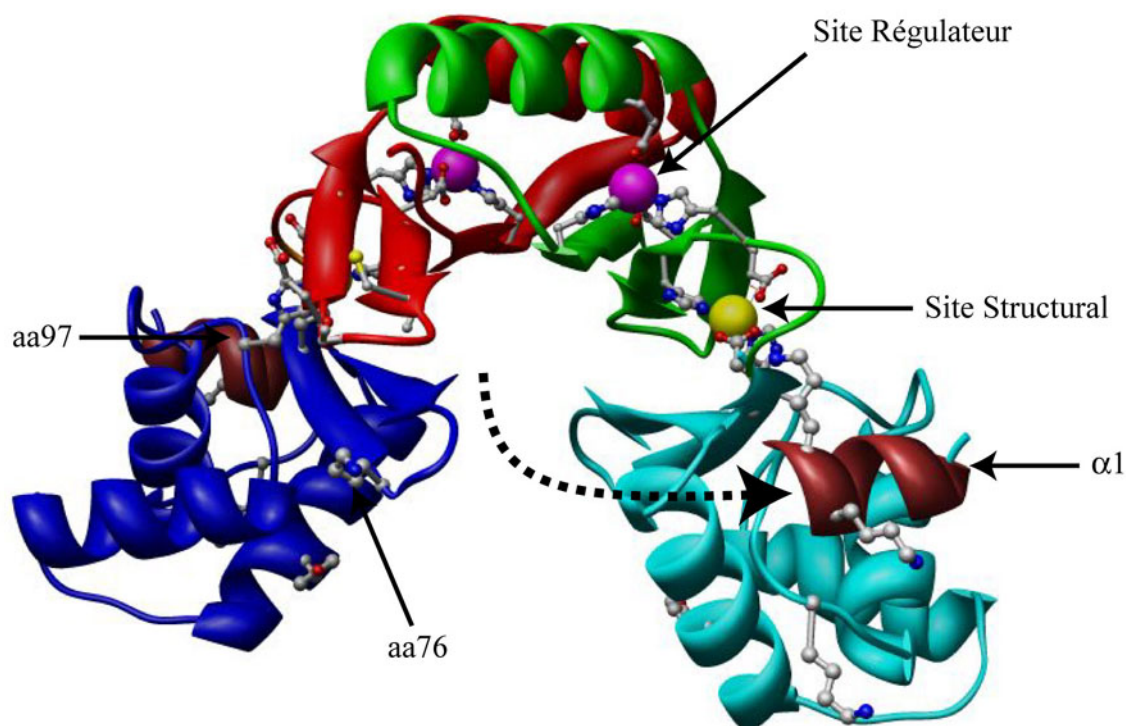


Figure VII.1 : Modèle chimère constitué de la superposition de FUR₁₋₈₂ (bleu et cyan) avec FUR de *P.aeruginosa* (le domaine N-terminal de celle-ci n'étant pas montré). Les domaines C-terminaux (rouge et vert correspondent à ceux de FUR de *P.aeruginosa*). Sous forme apo, les résidus non structurés de l'extrémité N-terminale pourraient être proches de la région centrale (positions 76 et 97) et du C-terminal de l'autre sous-unité. L'incorporation de métal entraînerait un changement conformationnel avec la rupture d'interactions stabilisant les résidus N-terminaux dans la région centrale. L'orientation de ces résidus serait alors modifiée, ils se structureraient en hélice α pour se positionner comme observé dans la figure (orientation identique dans *E.coli* et *P.aeruginosa*). La flèche en pointillé montre le mouvement supposé des résidus N-terminaux (marrons) lors de l'activation de la protéine par le métal.

Bien entendu, ce mécanisme implique une réorganisation structurale importante de la protéine lors de l'activation du dimère (rupture d'interactions, structuration en hélice α et réorientation de l'extrémité N-terminale). Notre hypothèse de mécanisme est néanmoins appuyée par la titration suivie par RMN du dimère (Zn_5FUR_D) par du Zn^{2+} qui montre que les réorganisations structurales sont importantes lors de l'incorporation du Zn(II) , les modifications spectrales observées étant très nombreuses. De plus, les modifications spectrales observées lors d'une expérience semblable réalisée sur du monomère FUR_M d'*E.coli* sont très faibles et suggèrent que l'incorporation de métal n'entraîne que des changements structuraux subtils dans le monomère. Ces deux observations permettent de proposer que l'incorporation de métal entraîne des effets vraisemblablement différents dans les deux espèces. Dans le dimère, ces réorganisations structurales peuvent être de nature quaternaire (réorientation d'une sous-unité par rapport à l'autre, modifications des interactions entre sous-unités) et/ou tertiaire (réorientation d'un domaine par rapport à l'autre).

D'autres données de la littérature sont compatibles avec la réorientation de l'extrémité N-terminale lors de l'incorporation de métal dans le site régulateur que nous proposons. En effet, Coy et *al.* (3) ont montré que FUR d'*E.coli* devient plus sensible à la trypsinolyse au niveau de la lysine 76 lors de l'incorporation de métal, comme si elle était protégée dans la forme non-métallée. D'après les données de

pontage des lysines, et notre modèle, la lysine 76 d'une sous-unité est proche de l'extrémité N-terminale de l'autre sous-unité dans la forme Zn_3FUR_D . Donc, si le métal entraîne une réorientation de l'extrémité N-terminale, cette lysine (et la région centrale) deviendra plus accessible au solvant, et donc aux protéases, ce qui expliquerait les résultats obtenus par Coy et *al.*

L'importance de l'hélice $\alpha 1$ dans l'activité de la protéine est également appuyée par le fait que Coy et *al.*, dans le même article, indiquent que la perte des 9 premiers résidus entraîne une baisse de spécificité de reconnaissance de l'ADN (3). D'autre part, il a été observé que la mutation A10G (acide aminé très majoritairement hydrophobe à chaîne aliphatique dans les différents organismes) chez *P.aeruginosa* empêche d'observer la liaison de la protéine sur le promoteur pvdS (1). Si l'on observe les structures de *P.aeruginosa* FUR et de FUR_{1-82} , on peut remarquer que dans les deux cas, l'alanine forme des contacts de Van der Waals avec les chaînes latérales des résidus 64 et 66 qui sont des acides aminés toujours hydrophobes dans les différents micro-organismes.

En conséquence, d'après toutes les données obtenues sur FUR d'*E.coli*, nous pouvons proposer que l'incorporation de métal entraîne un changement de conformation et d'orientation de l'extrémité N-terminale. Celle-ci passerait d'une localisation proche de la région centrale et notamment des lysines 76 et 97 (de l'autre sous-unité), à la position observée dans la structure cristallographie de FUR_{1-82} . Dans le même temps, elle passerait d'une conformation non structurée à une conformation en hélice α .

On peut se demander maintenant comment l'incorporation de métal peut entraîner la formation de l'hélice $\alpha 1$.

VII.3 Discussion sur l'activation par les ions métalliques

Il est aujourd'hui très difficile de répondre à cette question. En effet, bien que la structure de la forme $Zn_RZn_SFUR_D$ de *P.aeruginosa* ait été obtenue, rien n'indique que les sites métalliques observés sont bien ceux observés dans toutes les protéines FUR. En effet, Friedman et *al.* (6), ont muté tous les acides aminés de *Bradyrhizobium japonicum* FUR (BjFur) correspondants aux acides aminés identifiés comme ligands du site régulateur ou du site structural dans la structure de FUR de *P.aeruginosa*. Tous les résidus d'un site sont mutés par des alanines. Ainsi, ils ont construit un mutant où le site régulateur n'existe normalement plus (BjFurS1), un autre où le site structural n'existe normalement plus (BjFurS2) et enfin un mutant où les deux sites n'existent normalement plus (BjFurS1S2). Ils ont ensuite étudié l'activité de liaison sur le promoteur *irr* de leur mutant et comparé à la protéine sauvage. Leurs résultats montrent que le mutant BjFurS1 se lie à l'ADN avec une affinité identique à celle de la protéine sauvage. Le mutant BjFurS2 lie toujours l'ADN avec une affinité presque identique à la protéine sauvage. Seul le double mutant BjFurS1S2

ne lie pas l'ADN dans les conditions de l'expérience. Ces résultats suggèrent que les sites métalliques observés dans la structure cristallographique de *P.aeruginosa* FUR, bien qu'ils soient constitués d'acides aminés conservés dans tous les organismes, ne correspondent pas forcément aux sites métalliques nécessaires *in vivo*. On peut aussi noter que Lewin et al. (18), ont obtenus des résultats, avant la publication de la structure, indiquant que FUR de *P.aeruginosa* ne possède ni de cystéines essentielles à son activité, ni d'atome de Zn(II) structural. De ce fait, rien n'indique que le site à Zn(II) observé dans la structure a une quelconque réalité physiologique. D'autre part, on peut rappeler que les données d'EXAFS et de spectrométrie de masse (9, 12), montrent que le site structural à Zn(II) de Zn₅FUR_D d'*E.coli* contient les cystéines C92 et C95 et de ce fait ne peut être identique au site structural observé dans la structure cristallographique de Zn_RZn₅FUR_D FUR de *P.aeruginosa*. La détermination structurale d'autres protéines FUR sera vraiment utile pour la validation du positionnement des sites métalliques.

La présence de Cd²⁺ dans la structure de FUR₁₋₈₂ chélaté par les chaînes latérales des résidus H32 et E80 (impliqués dans la coordination du Zn(II) dit structural dans la structure de FUR de *P.aeruginosa*) est intéressante car elle indique que les chaînes latérales de ces deux résidus sont naturellement des ligands d'ions divalents dans la protéine. Comme le Cd²⁺ est souvent utilisé pour localiser par RMN les ligands du Zn²⁺ dans les structures en doigts de zinc (10, 13, 14), on peut supposer que le Zn²⁺ puisse remplacer le Cd²⁺ dans le site métallique observé. Dans ce cas, la présence des C92 et C95 comme ligand du Zn(II) dans Zn₅FUR_D d'*E.coli* (9, 12) ne pourrait s'expliquer que si la position relative du feuillet β1/β2 par rapport au feuillet β3/β4 est différente de celle observée dans la structure cristallographique de Zn_RZn₅FUR_D de *P.aeruginosa*. Néanmoins, le modèle de Zn_RZn₅FUR_D de FUR d'*E.coli* réalisé avec Swiss-model à partir de la structure cristallographique de Zn_RZn₅FUR_D de *P.aeruginosa* montre que les chaînes latérales des cystéines C92 et C95 ne pointent pas vers le feuillet β1/β2. Dans ce cas, il est difficile d'envisager un site structural à Zn(II) impliquant ces deux cystéines si le site structural à Zn(II) est également constitué des résidus H32 et E80 comme dans la structure de Zn_RZn₅FUR_D de *P.aeruginosa*. Cependant, dans ce modèle les contraintes imposées par les ions métalliques ont été conservées, ce qui ne reflète certainement pas la réalité pour FUR d'*E.coli*, mais ce qui montre justement que l'agencement relatif des brins β1, 2, 3 et 4 est très probablement différent.

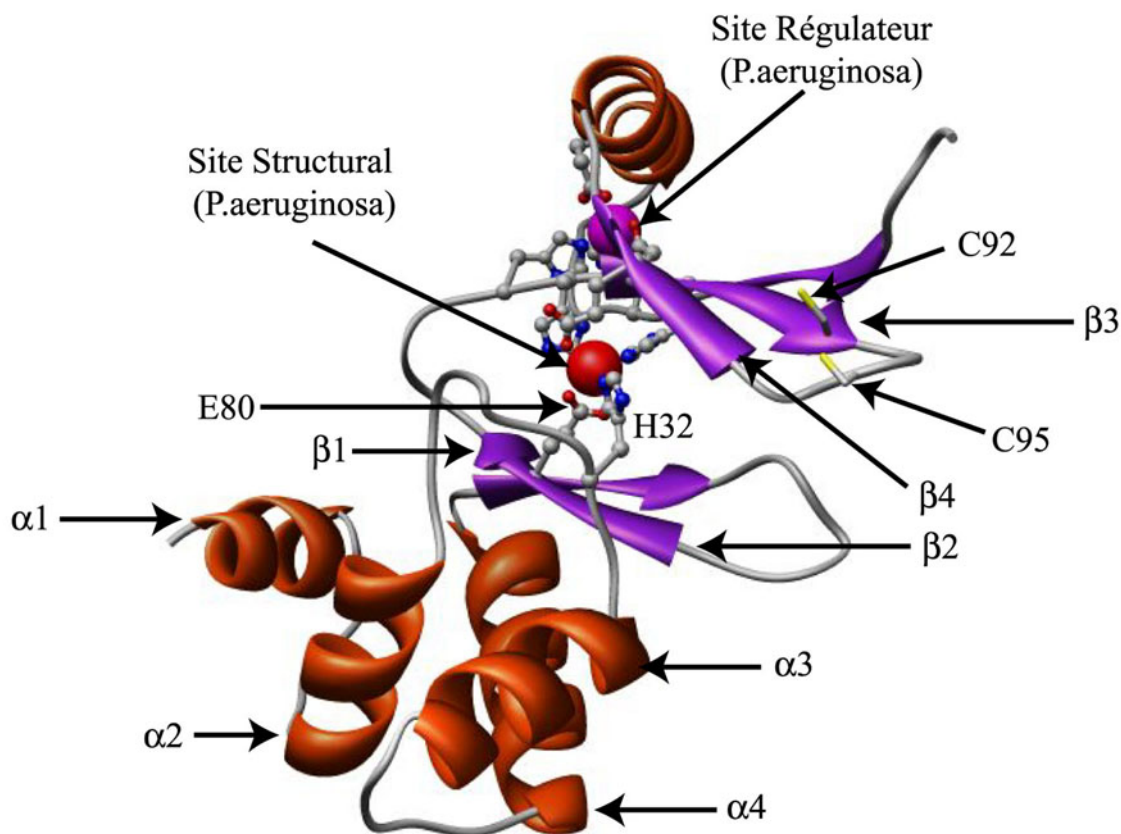


Figure VII.2 : Modèle de $Zn_RZn_SFUR_D$ de FUR d'*E.coli* réalisé avec Swiss-model à partir de la structure cristallographique de $Zn_RZn_SFUR_D$ de *P.aeruginosa*. Les Zn(II) (sphères rouge et violette) correspondent aux Zn(II) observés dans la structure cristallographique de FUR de *P.aeruginosa*.

En conséquence, les données de Lewin et al. (18) sur FUR de *P.aeruginosa*, les données d'EXAFS et de spectrométrie de masse sur FUR d'*E.coli* (9, 12) suggèrent que le site à Zn(II) dit structural présent dans FUR d'*E.coli* n'est pas localisé au même endroit que celui proposé dans FUR de *P. aeruginosa*.

En conclusion, on peut supposer que les régions autour des sites métalliques ne sont pas forcément structurées comme on peut l'observer dans la structure cristallographique.

En l'absence de structures tridimensionnelles des formes inactives et actives de protéines FUR de différents organismes, il n'est pas possible d'établir un modèle précis expliquant l'activation des régulateurs de la famille FUR.

VII.4 Discussion sur la liaison à l'ADN du monomère et du dimère

D'après les résultats d'EMSA, les complexes dimère/ADN et monomère/ADN ont des tailles identiques. Il en résulterait une stoechiométrie de 2 dimères/ADN et 4 monomères/ADN dans le cas de la reconnaissance de la séquence consensus.

Comment expliquer les différences d'affinité observées ?

La comparaison de la liaison à la séquence consensus du monomère et de FUR₁₋₈₂ montre que FUR₁₋₈₂ ne se lie pas spécifiquement à l'ADN alors que le monomère, lui, se lie spécifiquement mais avec une affinité apparente en excès de métal 5 fois inférieure à celle du dimère. La superposition des spectres HSQC ¹H-¹⁵N du monomère et de FUR₁₋₈₂ suggère que les domaines N-terminaux des deux formes sont très proches, la majorité des résonances étant superposables. Dans ce cas, la seule différence entre les deux formes réside dans la présence du domaine C-terminal peu structuré dans le monomère. D'autre part, la liaison du monomère à l'ADN est métal-dépendante. Ceci confirme l'importance du domaine C-terminal dans la liaison, ce domaine contenant les résidus qui lient le métal dans le site régulateur du dimère. Il est alors important de rappeler qu'un site métallique a été observé dans le monomère à l'aide du Co²⁺ et du Fe²⁺ avec différentes techniques spectroscopiques. D'après ces données, ce site possède des caractéristiques spectroscopiques comparables à celle du site régulateur dans le dimère de FUR. On peut se demander si le métal ne peut pas aller aussi dans le site structural présent dans *P.aeruginosa* puisque les ligands sont conservés. L'incorporation de métal par le monomère entraîne donc des changements conformationnels permettant la liaison à l'ADN. Le mode de liaison du monomère n'est toujours pas connu. Celui-ci pourrait se lier en tant que monomère et les interactions protéines/ADN seraient renforcées par la présence du domaine C-terminal qui permettrait d'établir des contacts supplémentaires. La plupart des régulateurs procaryotes interagissent avec l'ADN sous forme de dimères (11) néanmoins, la liaison de monomère à l'ADN a effectivement été observée pour les régulateurs de la famille AraC comme Rob (17) ou encore MarA (23). D'autre part, comme cité plus haut, Friedman et *al.* (6) ont muté tous les acides aminés de *Bradyrhizobium japonicum* identifiés comme ligands des métaux d'après la structure cristallographique de *Pseudomonas aeruginosa* FUR. Ces acides aminés sont conservés chez tous les membres de la famille FUR. Dans leur mutant BjFurS2, tous les résidus identifiés dans la coordination du zinc d'après la structure de *P.aeruginosa* FUR sont remplacés par des alanines. Ils ont ainsi montré que ce mutant est capable de lier l'ADN avec une affinité proche de celle de la protéine sauvage. Les auteurs n'ont pas déterminé l'état oligomérique de ce mutant. D'après ces résultats, nous ne pouvons pas exclure que leur protéine purifiée est monomérique. Dans ce cas, leurs observations seraient en accord avec nos résultats montrant la fixation du monomère de FUR d'*E.coli* avec une affinité comparable à celle du dimère en excès de métal.

Une autre hypothèse serait que le monomère dimérise sur l'ADN. Ce mécanisme a été observé pour les domaines de liaison à l'ADN des récepteurs nucléaire de stéroïde (19) ou encore pour les facteurs de transcription de type leucine ou hélice-boucle-hélice zippé (16). Cette hypothèse semble la plus probable si l'on considère les données RMN et le dichroïsme circulaire du monomère en présence de métal. D'après les données RMN, le domaine C-terminal est peu structuré mais il semble que les résidus 105 à 115 (zone correspondant à $\alpha 5$ dans Zn₅FUR_D) aient une tendance à s'organiser en hélice α . D'après le dichroïsme circulaire, l'incorporation de Mn²⁺ dans le monomère entraîne une structuration en hélice α . Cette structuration pourrait donc correspondre à la stabilisation de la structure secondaire de ces résidus en hélice, le résidu E107 étant impliqué dans la coordination du métal dans le site régulateur du dimère d'après la structure cristallographique. Cette hélice correspondrait à l'hélice $\alpha 5$ du dimère qui est impliquée dans l'interface de dimérisation dans le dimère de FUR dimère. Cette hypothèse est d'ailleurs confirmée par les expériences de cross-link à l'EDC réalisées sur du monomère en présence d'ADN consensus. Ces expériences montrent que des pontages covalents entre monomère ne sont pas observés en absence d'ADN, contrairement au dimère où des cross-link entre sous-unités sont obtenus avec un bon rendement. Par contre, des pontages entre monomères sont obtenus en présence d'ADN ce qui suggère que les monomères sont très proches dans le complexe protéine/ADN. L'ADN permettrait le rapprochement des hélices alpha et la formation du feuillet $\beta 5$. Il serait particulièrement intéressant d'avoir des informations sur le monomère lié à l'ADN. On pourrait imaginer des expériences de dichroïsme circulaire en présence de l'ADN comme cela a été réalisé sur RepA (5) ou bien des expériences de RMN 2D en regardant l'effet de l'ajout d'ADN en présence de FUR monomère et de sous-stœchiométrie en zinc.

Dans ce cas, la question de la fonctionnalité du monomère se pose, la forme identifiée comme active *in vivo* étant un dimère (2). Nous avons montré sans en discuter dans ce manuscrit (cf publication en annexe) que du monomère peut être obtenu à partir de dimère en présence de peroxyde d'hydrogène et donc en conditions de stress oxydant. Nous avons montré que le monomère oxydé conserve une activité de liaison à l'ADN mais avec une affinité moins forte. L'affinité apparente en excès de métal du monomère pour l'ADN cinq fois moins forte pourrait être à l'origine de modification des mécanismes de régulations *in vivo*. La conversion dimère/monomère pourrait donc être peut-être un nouveau mode de régulation pour la protéine FUR permettant de contrôler plus finement certains promoteurs. Il sera particulièrement intéressant de tester l'existence de monomère *in vivo* en conditions de stress.

Le motif CXXC des cystéines C92 et C95 chez *E.coli* FUR est conservé dans beaucoup de FUR de différents micro-organismes, ceci suggère que ce mécanisme pourrait avoir lieu avec la plupart des protéines FUR. La protéine FUR de *P.aeruginosa* fait partie des quelques exemples où la cystéine C95 n'est pas conservée, celle-ci étant remplacée par une thréonine. Par contre, le motif CXXC est conservé dans de nombreuses protéines FUR-like telles que PerR, FurA, CatR et FurS qui sont décrits comme des senseurs du stress oxydant (24, 25). Chez *Streptomyces reticuli* FurS, une FUR-like contenant du zinc, les cystéines C96

et C99 (correspondantes aux C92 et C95 chez *E.coli*) sont sensibles à l'oxydation. La formation d'un pont disulfure entre les C96 et C99, avec le relargage du zinc, sous l'action d'un oxydant (H_2O_2 ou diamide) est supposée être la cause de la dissociation du complexe FurS/ADN (21). D'après nos résultats, il serait clairement intéressant d'étudier les états oligomériques de FurS en présence et en absence d'oxydant et de les relier à l'état rédox des cystéines et du contenu de la protéine en zinc, et nous pouvons postuler que FurS oxydé devrait être monomérique.

De manière plus générale, le traitement au peroxyde d'hydrogène permet de supprimer la liaison à l'ADN des protéines FurA, FurS et CatR. Dans le cas de FurS, on constate également la libération de zinc. De ce fait, nos résultats permettent de faire l'hypothèse que la sensibilité au stress oxydant des protéines FUR et FUR-like implique la formation d'un pont disulfure entre les C92 et C95 (numérotation de FUR d'*E.coli*), normalement ligands de l'ion $Zn(II)$ avec une diminution de structuration et une dissociation du dimère en monomère oxydé. Il sera particulièrement intéressant de tester la formation de monomères oxydés dans les protéines FUR-like senseur de stress oxydant et leur capacité à se lier à l'ADN. On peut comparer ce mécanisme avec le mécanisme appelé « redox zinc switch ». Ce mécanisme se retrouve lorsque des protéines sont activées par une oxydation des thiols permettant la libération de zinc. Dans le cas de Hsp33, son activation permet à la protéine de dimériser. Un point important à remarquer de la comparaison des protéines Fur classiques par rapport aux protéines Fur-like senseur de H_2O_2 , c'est une différence au niveau du couple de cystéines C-terminales (position 132 et 137 dans FUR de *E. coli*). Les protéines du type FurS ou PerR contiennent un motif CxxC alors que les protéines FUR classiques contiennent un motif CxxxxxC. Cette différence pourrait être à l'origine de leur réactivité comme le suggère l'étude au laboratoire de mutants sur ce couple de cystéines.

Il a récemment été suggéré que la répression de l'expression des gènes *fes* et *ydiE* chez *E.coli* est levée en présence de H_2O_2 (20). Les auteurs suggèrent que cette dérégulation serait due à FUR. Chez *Cyanobacterium synechocystis*, FUR contrôle l'expression d'une peroxiredoxine de type 2-like, appelée SLL1621, une enzyme antioxydante essentielle à la croissance phototrophique (15). La liaison de FUR sur la région en amont de *sll1621* est inhibée par H_2O_2 et induite par du DTT. Ces résultats sont corrélés avec l'induction de *sll1621* à la suite d'un traitement par H_2O_2 en présence d'une luminosité forte. Un contrôle rédox médié par une conversion monomère vers dimère pourrait expliquer ces résultats. En ce sens, si ce mécanisme existe, cela montrerait un nouveau mode d'action de FUR en tant que régulateur global. Un tel mécanisme montrant des différences d'action entre les formes dimériques et monomériques a été observé pour RepA (7). En tant que dimère, cette protéine se fixe sur son promoteur et réprime son expression. En tant que monomère, RepA reconnaît un promoteur constitué d'un motif répété 4 fois et agit dans ce cas en tant qu'initiateur de la réplication de l'ADN.

Comme nous n'avons comparé la liaison à l'ADN du dimère et du monomère que sur la séquence consensus, nous ne pouvons que spéculer sur un éventuel modèle de régulation de ce type en conditions de stress oxydatif. Ce modèle ne concernerait que les protéines FUR contenant un motif proche du motif CXXC avec des cystéines proches telles que les C92 et C95 chez *E.coli*.

En conclusion générale, nous avons obtenu des informations structurales ainsi que des informations sur la réactivité des protéines FUR d'*E. coli* monomère, dimère et tronquée qui nous permettent de proposer un mécanisme pour l'activation de la protéine. Nos résultats permettent aussi de postuler l'existence d'un mécanisme plus général de réponse de FUR et peut-être des FUR-like au stress oxydant qui passe par la libération du zinc, l'oxydation de thiols et la formation d'espèce monomérique. Il reste maintenant à développer les approches expérimentales afin de vérifier et de confirmer ces hypothèses.

Références bibliographiques

1. Barton HA, Johnson Z, Cox CD, Vasil AI, Vasil ML. 1996. Ferric uptake regulator mutants of *Pseudomonas aeruginosa* with distinct alterations in the iron-dependent repression of exotoxin A and siderophores in aerobic and microaerobic environments. *Mol Microbiol* 21: 1001
2. Braun V, Schäffer S, Hantke K, Tröger W. 1990. Regulation of Gene Expression by Iron. In *The Molecular Basis of Bacterial Metabolism. Colloquium Mosbach 1990*, pp. 165. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
3. Coy M, Neilands JB. 1991. Structural dynamics and functional domains of the fur protein. *Biochemistry* 30: 8201
4. D'Autréaux B. 2002. *Etudes spectroscopiques de la protéine FUR (Ferric Uptake Regulation). Interaction avec le monoxyde d'azote*. Scientific thesis. UJF, Grenoble
5. Diaz-Lopez T, Lages-Gonzalo M, Serrano-Lopez A, Alfonso C, Rivas G, et al. 2003. Structural changes in RepA, a plasmid replication initiator, upon binding to origin DNA. *J Biol Chem* 278: 18606
6. Friedman YE, O'Brian MR. 2004. The ferric uptake regulator (Fur) protein from *Bradyrhizobium japonicum* is an iron-responsive transcriptional repressor in vitro. *J Biol Chem* 279: 32100
7. Giraldo R, Andreu JM, Diaz-Orejas R. 1998. Protein domains and conformational changes in the activation of RepA, a DNA replication initiator. *Embo J* 17: 4511
8. Gonzalez de Peredo A. 2000. *Etude structurale de la protéine FUR (Ferric Uptake Regulation) d'Escherichia coli par spectrométrie de masse*
9. Gonzalez de Peredo A, Saint-Pierre C, Adrait A, Jacquamet L, Latour JM, et al. 1999. Identification of the two zinc-bound cysteines in the ferric uptake regulation protein from *Escherichia coli*: chemical modification and mass spectrometry analysis. *Biochemistry* 38: 8582
10. Houben K, Wasielewski E, Dominguez C, Kellenberger E, Atkinson RA, et al. 2005. Dynamics and metal exchange properties of C4C4 RING domains from CNOT4 and the p44 subunit of TFIIF. *J Mol Biol* 349: 621
11. Huffman JL, Brennan RG. 2002. Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Curr Opin Struct Biol* 12: 98
12. Jacquamet L, Aberdam D, Adrait A, Hazemann JL, Latour JM, Michaud-Soret I. 1998. X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the fur protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 37: 2564
13. Kellenbach E, Maler BA, Yamamoto KR, Boelens R, Kaptein R. 1991. Identification of the metal coordinating residues in the DNA binding domain of the glucocorticoid receptor by ¹¹³Cd-1H heteronuclear NMR spectroscopy. *FEBS Lett* 291: 367

14. Knegtel RM, Boelens R, Ganadu ML, George AV, van der Saag PT, Kaptein R. 1993. Heteronuclear ^{113}Cd - ^1H NMR study of metal coordination in the human retinoic acid receptor-beta DNA binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 492
15. Kobayashi M, Ishizuka T, Katayama M, Kanehisa M, Bhattacharyya-Pakrasi M, et al. 2004. Response to oxidative stress involves a novel peroxiredoxin gene in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* 45: 290
16. Kohler JJ, Metallo SJ, Schneider TL, Schepartz A. 1999. DNA specificity enhanced by sequential binding of protein monomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11735
17. Kwon HJ, Bennik MH, Demple B, Ellenberger T. 2000. Crystal structure of the *Escherichia coli* Rob transcription factor in complex with DNA. *Nat Struct Biol* 7: 424
18. Lewin AC, Doughty PA, Flegg L, Moore GR, Spiro S. 2002. The ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* has no essential cysteine residues and does not contain a structural zinc ion. *Microbiology* 148: 2449
19. Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB. 1991. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352: 497
20. Mukhopadhyay P, Zheng M, Bedzyk LA, LaRossa RA, Storz G. 2004. Prominent roles of the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive nitrogen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 745
21. Ortiz de Orue Lucana D, Schrempf H. 2000. The DNA-binding characteristics of the *Streptomyces reticuli* regulator FurS depend on the redox state of its cysteine residues. *Mol Gen Genet* 264: 341
22. Pohl E, Haller JC, Mijovilovich A, Meyer-Klaucke W, Garman E, Vasil ML. 2003. Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* 47: 903
23. Rhee S, Martin RG, Rosner JL, Davies DR. 1998. A novel DNA-binding motif in MarA: the first structure for an AraC family transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10413
24. van Vliet AH, Baillon ML, Penn CW, Ketley JM. 1999. *Campylobacter jejuni* contains two fur homologs: characterization of iron-responsive regulation of peroxide stress defense genes by the PerR repressor. *J Bacteriol* 181: 6371
25. Zou P, Borovok I, Ortiz de Orue Lucana D, Muller D, Schrempf H. 1999. The mycelium-associated *Streptomyces reticuli* catalase-peroxidase, its gene and regulation by FurS. *Microbiology* 145 (Pt 3): 549

Chapitre VIII

Matériel et Méthode

VIII.1 Surexpression de la protéine marquée en milieu minimum M9

Le gène FUR a été cloné dans le plasmide pET-30c (Novagen) entre les sites *NdeI* et *XhoI* par Beate Bersch (IBS/LRMN, Grenoble France).

Des colonies de bactéries *E.coli* BL21 DE3 transformées avec le plasmide pET-30c-FUR sont obtenues sur milieu solide (LB + agar + Kanamycine 50 µg/mL) à 37°C. Une colonie est prélevée et inoculée dans 10 mL de milieu LB contenant de la Kanamycine à 50 µg/mL sur la journée. Les cellules sont alors centrifugées à 1500g pendant 1 minute puis reprises dans 100 mL de milieu M9 non marqué contenant de la Kanamycine à 50 µg/mL. La culture se poursuit sur la nuit à 37°C. Les cellules sont centrifugées à 1500g pendant 1 minutes puis reprises dans 1 L de milieu M9 marqué contenant de la Kanamycine à 50 µg/mL. A ce stade, la DO à 600 nm est d'environ 0.1.

	c _{final}	-> 10 ml	-> 50 ml	-> 100 ml	-> 500 ml	-> 1 L
M9 salts		10 ml	50 ml	100 ml	500 ml	1000 ml
glucose (20%)	4 g/L	200 ul	1 ml	2 ml	10 ml	20 ml
MgSO ₄ (1 M)	1 mM	10 ul	50 ul	100 ul	500 ul	1 ml
CaCl ₂ (0.1 M)	0.1 mM	10 ul	50 ul	100 ul	500 ul	1 ml
MnCl ₂ (0.1 M)	0.1 mM	10 ul	50 ul	100 ul	500 ul	1 ml
ZnSO ₄ (50 mM)	50 µM	10 ul	50 ul	100 ul	500 ul	1 ml
vitamines		20 ul	100 ul	200 ul	1 ml	2 ml
FeCl ₃ (100 mM)	50 µM	5 ul	25 ul	50 ul	250 ul	500 ul
Kanamycine (50 mg/ml)	50 mg/L	10 ul	50 ul	100 ul	500 ul	1 ml

Tableau VIII.1 : Composition du milieu M9.

pyridoxine	25 mg
biotin	25 mg
panthothénate, hemi calcium	25 mg
acide folique	25 mg
chlorure de choline	25 mg
niacineamide	25 mg
riboflavine	2,5 mg
thiamine	125 mg

Tableau VIII.2 : Composition de la solution de vitamines.

VIII.1.1 Cas de FUR marquée ^{15}N et $^{15}\text{N} / ^{13}\text{C}$ -FUR

Dans le cas de ^{15}N -FUR, le milieu M9 contient 1 g/L de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (seule source d'azote) et dans le cas de $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -FUR le milieu M9 contient, en plus de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, 2 g/L de {U - ^{13}C }-glucose. Lorsque la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ est comprise entre 0,5 et 0,6 la biosynthèse de FUR est induite par l'ajout de 0,5 mM d'IPTG et se déroule pendant 3 à 4 heures.

VIII.1.2 Cas de FUR marquée $^2\text{H} / ^{15}\text{N} / ^{13}\text{C}$ -FUR

Dans ce cas, 2 types de cultures ont été testés :

- Dans un premier cas, une préculture de 20 ml est réalisée à 37°C dans du milieu LB contenant 50% de D_2O . Après une nuit, les cellules sont centrifugées (1500 g, 1 min, 4°C) puis lavées avec 2 fois 20 ml de milieu minimum M9 non marqué. Les cellules sont conservées pendant la journée à 4°C dans 20 ml de milieu M9 contenant 100% de D_2O , 1 g/L de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ et 2 g/L de ^{13}C -glucose uniformément marqué. Une seconde préculture est effectuée durant la nuit dans 100 ml de milieu M9 triplement marqué contenant 90% D_2O (vérifié par évaporation). Après centrifugation, les cellules sont resuspendues dans 1 L de milieu M9 triplement marqué et laissées à incuber à 37°C. Dans ces conditions, le temps de génération est d'environ 1 heure. Lorsque la DO mesurée à 600 nm a atteint 0,5, l'expression de Fur est induite par l'addition d'IPTG à 0,5 mM final. Après 4 à 5 heures à 37°C, les cellules sont finalement récupérées par centrifugation (5000g, 10 min, 4°C).
- Dans un second cas, nous avons utilisé 1L de milieu riche commercial (Silantes OD2 CDN $^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ lot # EC CDN-0802-28). Une colonie a été reprise dans 10 mL de LB 100% D_2O contenant de la Kanamycine. Les cellules ont eu besoin de 24h pour bien pousser. Une 2^{ème} préculture est réalisée dans du LB 100% D_2O . Une dernière préculture est faite dans 40 mL de milieu Silantes. Les cellules sont centrifugées 1500g 1 minute puis reprises dans 40 mL de milieu Silantes. Deux erlenmeyers de 2 L sont utilisés et 460 mL de milieu Silantes contenant de la Kanamycine sont ajoutés dans chaque erlenmeyer avant de les inoculer avec 20 mL de cellules. La culture est induite lorsque $\text{DO}_{600\text{nm}}$ est de 0,75 et la biosynthèse de FUR se déroule durant 5h.

VIII.2 Extraction et purification de FUR

Le protocole de purification est un protocole bien établi et également décrit dans la littérature (2).

VIII.2.1 Obtention des Extraits protéiques

Les réactifs utilisés proviennent de Sigma-Aldrich.

Après culture, les cellules sont centrifugées à 5000g pendant 5 minutes à 6°C. Les culots de bactéries correspondant à 1L de culture sont redissous dans 30 mL de MOPS 100 mM pH 8, EDTA 20 mM (100 mM dans le cas de purifications visant à avoir plus de monomère), 10% m/v de sucrose, 10% glycérol v/v contenant 3 inhibiteurs de protéases : l'ICT (inhibiteur de la trypsine et de la chymotrypsine) 10 mg/mL, le PMSF à 10 µg/mL et la pepstatineA à 4 µg/mL.

La suspension bactérienne est soniquée pendant 10 cycles de 30 secondes (pulser 3,5 ; amplitude 90) avec une pause de 5 minutes au 5^{ème} cycle. Les membranes sont alors éliminées par une centrifugation à 20 000 g pendant 20 minutes à 6°C. L'ajout sulfate de streptomycine 1% m/v pendant 30 minutes à 6°C (sous agitation) permet de précipiter en partie les acides nucléiques. Le précipité est éliminé par une centrifugation à 35 000g pendant 30 minutes à 6°C. Les protéines du surnageant sont précipitées par « salting-out » en amenant progressivement la concentration en sulfate d'ammonium à 77,5 %. La précipitation se déroule sur la nuit (sous agitation) à 6°C. Le précipité est récupéré par une centrifugation à 35 000 g pendant 30 minutes à 6°C et redissous dans environ 30 mL de Tris/HCl 20 mM pH 8 contenant du glycérol à 10% v/v. Afin d'éliminer les sels, les extraits protéiques sont dialysés 2 fois 2 heures dans 2 L de tampon Tris/HCl 50 mM pH 8 contenant du glycérol à 10% v/v. Le matériel insoluble est éliminé par une centrifugation à 35 000 g pendant 20 minutes à 6°C avant de charger les protéines solubles sur une colonne d'affinité.

VIII.2.2 La colonne d'affinité

Cette première étape de purification repose sur l'affinité de la protéine FUR, qui contient 12 résidus histidines, pour le Zn. Le système utilisé comprends 3 colonnes Hitrap chelating HR de 5 mL montées en série et installées sur un système Akta Purifier (Amersham Biosciences).

La colonne est préalablement chargée par une solution de ZnSO₄ à 20 mM (dissous dans H₂O) puis lavée avec du Tris/HCl 20 mM pH 8 jusqu'à ce que le pH remonte à 8. Les extraits protéiques sont injectés sur la colonne à 0,5 mL.min⁻¹. La colonne est alors successivement rincée avec 320 mL de Tris/HCl 20 mM pH 8, suivi de 180 mL de Tris/HCl 20 mM pH 8 (NH₄)₂SO₄ 500 mM, 120 mL de BisTris 100 mM pH 6,5 à 0,8 mL.min⁻¹. Un lavage final est réalisé avec 200 mL de Tris/HCl 20 mM pH 8 glycine 25 mM à 0,5 mL.min⁻¹.

La protéine est éluée par une solution de α D,L – histidine à 50 mM diluée dans du Tris/HCl 20 mM pH 8 glycine 25 mM.

Les fractions contenant la protéine sont regroupées. Du glycérol est ajouté de manière à avoir 10% v/v final. Le tout est traité avec de l'EDTA à une concentration finale de 20 mM pendant 30 minutes (1h si l'on travail pour avoir du monomère) sous agitation à 6°C afin de se débarrasser du Zn^{2+} élué par l'histidine. La protéine est alors précipitée par l'ajout de 80% de sulfate d'ammonium. Après une nuit, le précipité est récupéré par une centrifugation à 35 000g pendant 30 minutes à 6°C puis redissous dans 3 à 4 mL de tampon Tris/HCl 100 mM pH 8 KCl 100 mM avant d'être injecté sur une colonne de filtration sur gel.

VIII.2.3 Purification sur colonne de filtration sur gel

Après la colonne d'affinité, la protéine FUR est presque pure mais se retrouve également sous différents états oligomériques. Il est donc nécessaire de séparer ces formes oligomériques pour obtenir une protéine homogène.

Avant injection la solution protéique est centrifugée à environ 10 000g pour se débarrasser des protéines non resolubilisées. Les protéines sont séparées inversement proportionnellement à leur taille sur une colonne Superdex 75 HR 16/60 (Amersham Biosciences) équilibrée dans du tampon Tris/HCl 100 mM pH 8 KCl 100 mM. La protéine FUR se retrouve dans les pics à 64,5 mL (dimère) et à 72 mL (monomère). Les pics observés avant 58 mL contiennent majoritairement de la protéine FUR sous forme d'oligomères (tétramère, hexamère octamère) qui sont difficilement utilisables.

Les fractions contenant du dimère de FUR pur ou du monomère pur sont regroupées et la concentration en KCl est ajustée à 0,5 M. Les échantillons de protéines sont alors concentrés sur ULTRAFREE (cutoff 5000, Millipore). La concentration de FUR, exprimée en monomère de FUR, est estimée par absorption UV en utilisant un coefficient d'extinction massique à 277 nm de $0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$ (10). La pureté de la protéine est contrôlée par gel SDS-PAGE à 15%.

VIII.2.4 Détermination du taux de marquage

Le taux de marquage ^{15}N a été déterminé de la manière suivante :

La masse monoisotopique théorique de FUR est $M_{\text{th}}=16664 \text{ Da}$ (protéine uniquement constituée de ^1H , ^{14}N , ^{12}C)

La masse expérimentale déterminée par spectrométrie de masse à ionisation electrospray est $M_{\text{exp}}=16872 \text{ Da}$.

Il y a 215 atomes d'azote dans la protéine en absence de la méthionine N-terminale qui est excisée d'après la spectrométrie de masse donc :

$$\text{Taux}(^{15}\text{N}) = \frac{M_{\text{exp}} - M_{\text{th}}}{\text{Nb}(\text{N})} = \frac{(16872) - (16664)}{215} = 0.97$$

Le taux de deutération est calculé de la manière suivante :

Le taux de marquage ^{15}N a été estimé à 0.97

La masse expérimentale déterminée par spectrométrie de masse à ionisation electrospray est $M_{\text{expérimentale}} = 18000 \text{ Da}$

La masse théorique obtenue pour 100% de marquage ^{13}C , 97% de marquage ^{15}N et 100% de marquage ^2H est :

$$M_{\text{th}} = M_{\text{monoisotopique théorique}} + \text{Nb}(\text{C}) + \text{Nb}(\text{N}) * 0.97 + \text{Nb}(\text{H}) - \text{Nb}(\text{H}_{\text{échangeable}})$$

Le nombre de protons échangeable est :

$$\begin{aligned} \text{Nb}(\text{H}_{\text{échangeable}}) = & \text{Nb}(\text{Arg}) * 2\text{H}_\text{N} + \text{Nb}(\text{Asn}) * 2\text{H}_\text{N} + \text{Nb}(\text{Cys}) * 1\text{H}_\text{N} + \text{Nb}(\text{Gln}) * 2\text{H}_\text{N} + \text{Nb}(\text{His}) * 2\text{H}_\text{N} + \\ & \text{Nb}(\text{Lys}) * 3\text{H}_\text{N} + \text{Nb}(\text{Ser}) * 1\text{H}_\text{N} + \text{Nb}(\text{Thr}) * 1\text{H}_\text{N} + \text{Nb}(\text{Trp}) * 1\text{H}_\text{N} + \text{Nb}(\text{Tyr}) * 1\text{H}_\text{N} + 2\text{H}_\text{N} \quad \text{du} \quad \text{N-} \\ & \text{terminal} + \text{Nb}(\text{résidu}-1) \text{ pour les } \text{H}_\text{N} \text{ de la chaîne polypeptidique-Nb(Pro)} \\ & = 279 \end{aligned}$$

$$\text{alors } M_{\text{th}} = 16664 + 730 + 215 * 0.97 + 1143 - 279 = 18466$$

Le nombre de protons non échangeables est $1143 - 279 = 864$

Le taux de deutération est donc :

$$\text{Taux}(^2\text{H}) = \frac{\text{Nb}(\text{H}_{\text{non échangeables}}) - (M_{\text{th}} - M_{\text{exp}})}{\text{Nb}(\text{H}_{\text{non échangeables}})} = \frac{864 - (18466 - 18000)}{864} = \frac{398}{864} = 0.46$$

VIII.3 Test de protection à la coupure

Le test de la protection à la coupure permet de mesurer la capacité de FUR de se lier à l'ADN. Il a été développé à l'origine par Bagg et al (3). Le plasmide pDT 10 a été construit par Danièle Touati (Institut Jacques Monod, Jussieu, Paris) et correspond à un plasmide pUC 19 dans lequel a été introduit une boîte FUR qui, dans notre cas, correspond au promoteur de l'aérobactine. Ce promoteur contient un site de restriction *HinfI*.

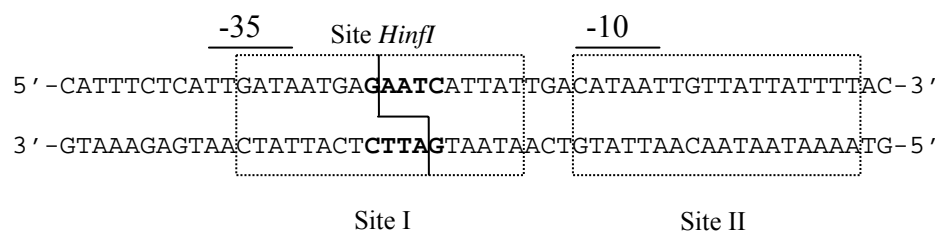


Figure VIII.1 : Site de coupure pour la nucléase *HinfI* dans le promoteur aérobactine. La zone de fixation correspond à la zone de fixation principale identifiée par empreinte à la DNase I. Les positions -10 et -35 délimitent la zone reconnue par l'ARN polymérase. Les encadrés en traits discontinus délimitent les « Iron Boxes ».

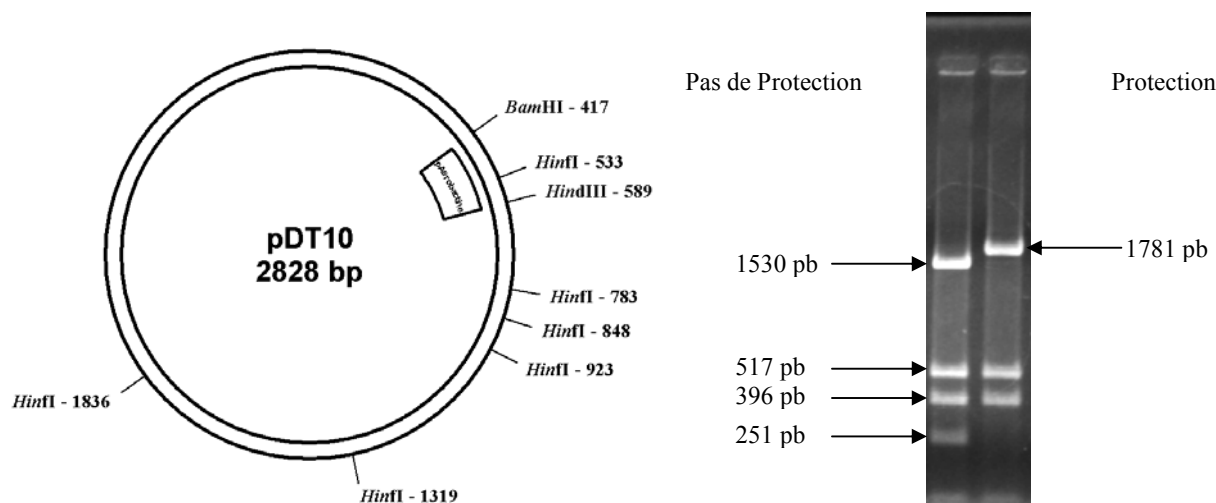


Figure VIII.2 : Site de coupure pour la nucléase *HinfI* dans le promoteur aérobactine. La zone de fixation correspond à la zone de fixation principale identifiée par empreinte à la DNase I. Les positions -10 et -35 délimitent la zone reconnue par l'ARN polymérase. Les encadrés en traits discontinus délimitent les « Iron Boxes ». L'insert contenant la boîte aérobactine a été introduit entre les sites BamHI et HindIII. La figure indique également tous les sites de restrictions *HinfI*. L'utilisation de l'enzyme *HinfI* en présence ou en absence de liaison de FUR conduit aux profils de digestion observés en B. Les plus petits fragments ne sont pas observables car ils sortent du gel pendant la migration.

Le test d'activité est réalisé dans un volume final (avant digestion) de 10 μ L, 1 μ L de plasmide pDT 10 à 500 nM est ajouté au tampon BTP 100 mM KCl 100 mM pH 7,5 $MgSO_4$ 5 mM (le magnésium est essentiel à l'activité de la DNase). Puis 1 μ L de solution de protéine à 200 μ M au minimum est ajouté. La protéine a été préalablement incubée avec 1 équivalent d'un métal activateur (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} ...) ou juste du tampon, pendant 30 minutes à température ambiante. L'incubation avec le plasmide se déroule pendant 30 minutes à température ambiante est ajouté. L'interaction se déroule pendant 30 minutes à température ambiante. Deux unités d'enzyme *HinfI* sont alors ajoutées et la digestion se déroule pendant 1h à 37°C. La réaction est arrêtée par l'ajout de 1 μ L d'EDTA 250 mM. Lorsque le test d'activité est réalisé avec du monomère, l'enzyme *HinfI* est changé contre son tampon normal d'incubation auquel le DTT a été retiré (Tris/HCl 10 mM NaCl 50 mM $MgCl_2$ 5 mM pH 7,5) pour ne pas avoir de problème de réduction du monomère et donc une concomitante formation de dimère. Les fragments de digestion sont séparés sur gel d'agarose 1,5%. L'ADN est visualisé par intercalation du Bromure d'éthidium.

VIII.4 Anisotropie de Fluorescence

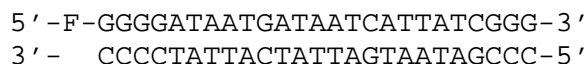
Les expériences d'anisotropie de fluorescence ont toutes été réalisées dans du tampon MOPS 20 mM KCl 125 mM MgSO₄ 12 mM poly-dIdC 10 µg.mL⁻¹. Le poly-dIdC est un polynucléotide de longueur variable permettant de s'affranchir de la liaison aspécifique. Le MgSO₄ permet de « masquer » les charges des phosphates de l'ADN afin de diminuer la concentration locale du Mn²⁺ près de l'ADN, le Mg²⁺ prenant sa place. Suivant les expériences, 10 nM d'ADN marqué avec une fluorescéine sur un seul brin sont titrés soit par des concentrations croissantes en protéines dimères (Zn₅FUR_D) ou en protéines monomères (FUR_M) soit par des concentrations croissantes en MnSO₄.

Dans le cas des titrations en protéines, 1 mM de MnSO₄ sont ajoutés à la solution. Pour les titrations en métal, les concentrations utilisées en protéines sont de l'ordre de 375 nM en sous-unité ([Zn₅FUR_D]_{sous-unité}=[FUR_M]≈375 nM). Les expériences ont été réalisées sur un fluorimètre Perkin-Elmer LB 50 dans des cuves de 3 mL thermostatées contenant 2 mL de solutions. Les expériences sont réalisées sous agitation et à 298 K.

Les paramètres optimaux pour obtenir le meilleur rendement de fluorescence sont :

λ_{exc} =494 nm, bande passante d'excitation= 2.5 nm, λ_{det} =527 nm, bande passante d'émission= 20 nm. Un filtre passe-haut 515 nm est utilisé.

Les oligonucléotides de synthèse simple brins ont été commandés chez Sigma et ont les séquences suivantes :



La sonde fluorescente utilisée est la fluorescéine car sa durée de demi-vie est de 4 ns. Celle-ci se situe dans la gamme de temps de corrélation de notre ADN. Le choix de la sonde est très important car la durée de vie du fluorophore influence directement le signal observé d'après l'équation de Perrin :

$$r = \frac{r_0}{1 + t/\tau_c} \quad \text{où } r_0 \text{ correspond à l'anisotropie limite (dont la valeur dépend de l'angle entre le dipôle}$$

d'absorption et d'émission) et t correspond au temps de demi vie du fluorophore. Si l'on veut voir un effet quantitatif, la durée de vie du fluorophore τ_c doit donc être de l'ordre du temps de corrélation t de la molécule observée.

Pour obtenir l'ADN double brin, chaque brin a été dissous à une concentration de 200 µM, dans du tampon Tris 10 mM pH 8 filtré à 0.22 µm. La concentration de chaque oligonucléotide est vérifiée par la mesure de l'absorption dans l'UV de la solution. Les deux brins sont ensuite mélangés avec un rapport 1 :1 à une concentration de 10 µM dans du tampon stérile Tris 10 mM pH 8 NaCl 300 mM. Le mélange est chauffé à 90°C pendant 15 minutes. La température est ensuite graduellement baissée de 90°C à 37°C par pas de

10°C toutes les 30 minutes. Lorsque la température est à 37°C, le mélange est incubé 2 heures avant d'être placé pendant une nuit à 4°C.

La formation du duplex est vérifiée sur gel d'agarose avec coloration au BET. La proportion de simplex est vérifiée par filtration sur gel analytique. Tous les échantillons de duplex obtenus sont composés de moins de 10% de simplex.

VIII.5 Dichroïsme circulaire

Les expériences de dichroïsme circulaire ont été réalisées sur un spectrophotomètre JASCO J-810 à température ambiante (température de la salle 21°C). Les spectres ont été enregistrés dans l'UV-lointain (190-250 nm) dans des cuves de 300 µL et de 1 mm de chemin optique.

Toutes les expériences ont été réalisées dans du tampon MOPS 20 mM KCl 40 mM pH 7 comme tampon de base. La concentration en KCl a dû être diminuée par rapport aux expériences d'anisotropie car les sels absorbent vers les 200 nm et interfèrent avec le signal.

Les conditions expérimentales de l'appareil sont les suivantes :

Bande passante : 4 nm ; pas : 0.5 nm ; vitesse : 100 nm.min⁻¹ ; réponse du détecteur : 2s. 4 scans par expériences sont enregistrés et moyennés.

VIII.5.1 Passage monomère-dimère

40 µL de monomère à 150 µM sont dilués dans le tampon MOPS 20 mM KCl 40 mM pH 7 afin d'obtenir une concentration finale de 20 µM dans 300 µL. Après 15 minutes d'équilibration, le spectre CD est enregistré. Pour obtenir le spectre du monomère réduit, 5 µL d'une solution de DTT à 1.2 mM dans le tampon d'incubation sont ajoutés 40 µL de monomère à 150 µM. La solution est laissée à équilibrer pendant 10 minutes puis est diluée afin d'obtenir un volume final de 300 µL. Le spectre CD est ensuite enregistré. La titration en ZnSO₄ a été réalisée à partir de différents échantillons à 20 µM de monomère dans un volume final de 300 µL. Les différents ajouts sont de 5 µL pour 0.3 équivalents de Zn²⁺ et le volume est complété à 300 µL par du tampon. Pour la titration, 4 échantillons ont été nécessaires. Après réduction du monomère de la même manière que décrit précédemment, 5 µL de solutions de ZnSO₄ à (360 µM, 720 µM, 1.3 mM et 1.5 mM) correspondant respectivement à 0.3, 0.6, 0.9 et 1.3 équivalents de Zn²⁺ sont ajoutés. La solution est diluée à 300 µL et laissée à incuber à température ambiante pendant 10 minutes avant d'enregistrer le spectre. Après enregistrement, les spectres obtenus sont convertis afin d'être exprimés en ellipticité molaire par résidu selon la formule :

$\theta_{MRW} = \frac{g_{obs}}{10.C.l.N}$ exprimé en (deg.cm².dmole⁻¹) où l est le chemin optique en cm, C la concentration en molaire et N le nombre de résidus.

VIII.5.2 Titration en métal

Pour le dimère, 40 µL de solution de protéine à 75 µM en sous-unité sont incubés avec un volume variable d'une solution de MnSO₄ à 20 mM diluée dans le tampon à partir d'une solution mère à 100 mM contenant 50 mM de H₂SO₄. Un échantillon différent est utilisé pour chaque point de mesure et la variation de pH est inférieure à 0.1 unité entre le début et la fin de l'expérience. Différents protocoles ont été réalisés. Une première série d'expérience a été réalisée en congelant les différents échantillons ne contenant que la protéine. Les échantillons sont ensuite décongelés au fur et à mesure de l'expérience. L'ajout de métal se fait après 5 min de décongélation, l'échantillon est complété à 300 µL avec le tampon MOPS 20 mM KCl 40 mM pH 7 puis laissé à incuber à température ambiante pendant 15 minutes avant d'être enregistré. Les spectres du tampon seul en présence de la même concentration en métal que pour l'échantillon contenant la protéine sont enregistrés et soustraits.

Une autre série d'expériences a été réalisée en préparant tous les échantillons en même temps. L'incubation est réalisée pendant une heure à température ambiante puis les spectres sont enregistrés. Les échantillons dont les spectres sont enregistrés en fin d'expériences ont incubés environ 30 minutes de plus que les premiers échantillons.

Pour le monomère, 40 µL de solution de protéine à 75 µM sont incubés avec un volume variable d'une solution de MnSO₄ à 20 mM diluée dans le tampon à partir d'une solution mère à 100 mM contenant 50 mM de H₂SO₄.

VIII.6 Construction de FUR₁₋₈₂

Pour réaliser cette protéine tronquée, nous avons utilisé le kit « QuikChange® » de Stratagene. Pour introduire cette mutation, il suffit de modifier le codon correspondant à la glutamine 84 en codon stop (CAG→TAG). Pour cela, nous utilisons les deux amorces complémentaires suivantes où la mutation est indiquée en gras :

5' CCGTATTTGAACTGACAT**T**AGCAACATCACCACGATC 3'
 5' GATCGTGGTGATGTTGCT**A**TGTCAGTTCAAATACGG 3'

Ces amorces sont complémentaires de chaque brin du gène *fur* sauf au niveau de la base à muter. La mutation est introduite par PCR avec les conditions suivantes :

- 28 ng d'ADN plasmidique (pET 30 *fur*) méthylé sur le motif G*ATC (l'étoile indiquant la base méthylée).
- 131 ng de chaque amorce
- 400 μ M de dNTP
- 2.5 unités de *PfuTurbo*[®]

La réaction se déroule dans un volume de 50 μ L de Tris/HCl 20 mM pH 8.8 KCl 10 mM (NH₄)₂SO₄ 10 mM MgSO₄ 2 mM triton X-100 0.1% BSA 1 mg/mL.

Le programme PCR est composé de 18 cycles, 1 cycle étant constitué des étapes suivantes :

- 1 minute à 95°C
- 1 minute à 55°C
- 1 minute à 68°C

Le produit de PCR est digéré par la *dpnI* pendant une heure à 37°C afin de dégrader l'ADN parental non muté (qui est méthylé). Cette DNase reconnaît l'ADN méthylé et hémiméthylé et le dégrade. Le produit de PCR est ensuite vérifié sur un gel d'agarose à 1.5% afin de vérifier la présence d'ADN double brin.

5 μ L du produit de PCR ont été utilisés pour transformer des bactéries XLI-Blue compétentes. Les cellules sont étalées sur une boîte de milieu LB contenant 50 μ g/mL de kanamycine comme facteur de sélection. Les cellules sont incubées une nuit à 37°C. Ensuite, 100 mL de LB contenant de la kanamycine à 50 μ g/mL sont inoculés avec une colonie de XLI Blue transformées afin de produire du plasmide. Le plasmide est extrait avec un kit « MidiPrep » de Qiagen. La séquence du plasmide a été vérifiée par séquençage par l'entreprise Génome Express.

Par la suite, des bactéries BL21 DE3 compétentes sont transformées avec le plasmide pour pouvoir produire de la protéine. Les colonies de bactéries *E.coli* BL21 DE3 sont obtenues sur milieu solide (LB + agar + Kanamycine 50 μ g/mL) à 37°C.

VIII.7 Culture et purification de FUR₁₋₈₂

Pour un litre de culture, une colonie est prélevée et inoculée dans 20 mL de milieu LB contenant de la Kanamycine 50 μ g/mL. La préculture se déroule sur la nuit à 37°C. Ensuite, un litre de milieu de culture (LB ou M9) contenant de la Kanamycine 50 μ g/mL est inoculé avec les 20 mL et la culture se déroule à 37°C. Lorsque la DO est à 0.7, de l'IPTG à une concentration finale de 0.5 mM est ajouté. L'induction se déroule pendant 3 à 4 heures.

Après culture, les cellules sont centrifugées à 5000g pendant 5 minutes à 6°C. Les culots de bactéries correspondant à 1L de culture sont redissous dans 30 mL de MOPS 100 mM pH 8, EDTA 100 mM, 10% m/v de sucrose, 10% glycérol v/v contenant 3 inhibiteurs de protéases : l'ICT (inhibiteur de la trypsine et de la chymotrypsine) 10 mg/mL, le PMSF à 10 µg/mL et la pepstatineA à 4 µg/mL.

La suspension bactérienne est soniquée pendant 10 cycles de 30 secondes (pulser 3,5 ; amplitude 90) avec une pause de 5 minutes au 5^{ème} cycle. Les membranes sont éliminées par une centrifugation à 20 000 g pendant 20 minutes à 6°C. Le surnageant est traité avec 1% m/v de sulfate de streptomycine pendant 30 minutes à 6°C (sous agitation). Le précipité est éliminé par une centrifugation à 35 000g pendant 30 minutes à 6°C. Une première étape de précipitation est réalisée à l'aide de 50% de sulfate d'ammonium pendant 3 heures à 6°C. Cette étape permet d'éliminer de nombreux contaminants. La solution est centrifugée à 25 000g pendant 30 minutes à 6°C. Les protéines du surnageant sont précipitées par 80% de sulfate d'ammonium à 6°C sur la nuit. Le précipité est récupéré par une centrifugation à 35 000 g pendant 30 minutes à 6°C et redissous dans environ 5 mL de Tris/HCl 100 mM pH 8 contenant du glycérol à 10% v/v. La dernière étape de purification est réalisée à l'aide d'une Superdex 75 HR 16/60 (Amersham) équilibrée dans du tampon Tris/HCl 100 mM pH 8 KCl 100 mM. La protéine FUR₁₋₈₂ sort à un volume de 75 mL et est pure à l'issue de cette étape. Les fractions contenant la protéine sont regroupées et concentrées.

La concentration en protéine est estimée à l'aide du dosage à l'acide bicinchoninique (Biorad) en se basant sur des courbes de référence réalisées à partir de BSA et de FUR pures. Les rendements de purification sont de l'ordre de 30 à 35 mg/L de culture.

VIII.8 RMN et cristallographie de FUR₁₋₈₂

VIII.8.1 Spectre ¹H-¹⁵N HSQC de FUR₁₋₈₂

Le spectre ¹H-¹⁵N HSQC de FUR₁₋₈₂ a été enregistré à 600 MHz à partir d'un échantillon à 1.8 mM de protéine dans le tampon MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7.5 à une température de 25°C.

A partir de la superposition des spectres du monomère et de FUR₁₋₈₂, les résonances de la protéine tronquée ont été attribuées.

VIII.8.2 Cristallographie

L'utilisation d'un robot de cristallisation a permis de tester 288 conditions simultanément. Des gouttes 1 :1 (protéine/tampon) ont été réalisées à partir d'une solution de protéine à 16 mg/mL dans du tampon MOPS 100 mM KCl 200 mM pH 7.5.

Parmi ces tests, des cristaux ont été observés dans les conditions :

- Acétate de sodium 100 mM PEG 300 30% (v/v) pH 4.6 293 K (en 4 jours)
- Acétate de sodium 100 mM PEG 400 30% (v/v) pH 4.6 CdCl₂ 100 mM 293 K (en 4 jours)
- MES 100 mM PEG 8000 25% (v/v) pH 6.5 293 K (2 semaines)

Les conditions de cristallisations ont été affinées et des cristaux de bonne qualité ont été obtenus dans les conditions :

- Acétate de sodium 100 mM PEG 200 30% (v/v) pH 4.6 CdCl₂ 100 mM 293 K en réalisant des gouttes 1 :1 et 2 :1. Les cristaux se forment en moins de 3 jours et correspondent à des plaques translucides.

Avant d'être congelé dans de l'azote liquide, les cristaux utilisés pour la collection des clichés ont d'abord été plongés dans du tampon de cristallisation contenant 25 % de glycérol comme cryoprotecteur. Les clichés de diffractions ont été collectés sur la ligne FIP (BM30A) de l'ESRF (9). Les clichés de diffraction ont été indexés à l'aide du programme XDS (5). La structure de FUR₁₋₈₂ a été déterminée par remplacement moléculaire à l'aide du programme Phaser (8) en se basant sur la structure des 84 premiers résidus de Zn₅FUR_D de *P.aeruginosa* (PDB :1MZB). Le premier modèle issu de Phaser a ensuite été introduit dans le programme ARP/WARP (7). Ce programme a permis de construire 139 résidus sur les 188 de l'unité asymétrique. Les acides aminés restant ont été construits à l'aide du programme coot (4). L'affinement de structure a été réalisé à l'aide du programme Refmac 5 de la suite CCP4 (1) dans la gamme de résolution de 30 à 1.8 Å. La qualité de la structure a été vérifiée à l'aide du programme PROCHECK (6).

VIII.9 Spectroscopie RMN sur le dimère

VIII.9.1 Attribution des résonances de la chaîne principale

Les résonances des noyaux de la chaîne principale ont été attribuées à partir d'expériences 3D enregistrées avec un échantillon triplement marqué ²H, ¹⁵N, ¹³C de Zn₅FUR_D deutéré à 46% et à une concentration de 2.6 mM dans du tampon MOPS 100 mM KCl 500 mM DTT 10 mM pH 7.5. L'échantillon a été préparé en anaérobie dans une boîte à gant sous argon. L'enregistrement était réalisé à une température de 25°C.

expériences	HNCO	MQ_HNCOCA	MQ_COHNCA	HN(CA)CO	HN(CA)CB	HN(COCA)CB
MHz	600	600	600	800	800	600
Découplage ^2H	non	oui	oui	oui	oui	oui
np (^1H)	1024					
ni (^{13}C)	128	150	150	120	120	ND
ni2 (^{15}N)	50	43	50	64	64	ND
sw (^1H)	9000.9	9000.9	9000.9	10000	10000	9000.9
sw1 (^{13}C)	2112.1	6000	6000	2800	13333.3	ND
sw2 (^{15}N)	1800	1800	1800	2400	2400	ND
Demi dwell time	D2/D3	D2/D3	D2/D3	D2/D3	D2/D3	ND
D1=(^1H), D2=(^{15}N), D3=(^{13}C)						
Matrice	512*128*256	512*128*512	512*128*512	512*128*256	512*128*256	
MI_LP(2)	Prédiction linéaire miroir dans la dimension azote					

Tableau VIII.3: Paramètres d'acquisitions des expériences 3D utilisées pour l'attribution de la chaîne principale du dimère.

VIII.9.2 Attribution des résonances des chaînes latérales

Les expériences (H)C(CO)NH-TOCSY et H(CCO)NH-TOCSY ont été enregistrées sur l'échantillon triplement marqué ^2H , ^{15}N , ^{13}C de $\text{Zn}_5\text{FUR}_\text{D}$ deutéré à 46% et à une concentration de 2.6 mM dans du tampon MOPS 100 mM KCl 500 mM DTT 10 mM pH 7.5. Les expériences (H)CCH-TOCSY et H(C)CH-TOCSY ont été enregistrées sur l'échantillon doublement marqué ^{15}N , ^{13}C de $\text{Zn}_5\text{FUR}_\text{D}$ et à une concentration de 1.5 mM dans du tampon deutéré MOPS 100 mM KCl 500 mM DTT 10 mM pH 7.5.

expériences	(H)C(CO)NH-TOCSY	H(CCO)NH-TOCSY	(H)CCH-TOCSY	CCH-TOCSY
MHz	600	600	600	600
np (^1H)	1024			
ni	110	110	128	128
ni2	50	50	128	128
sw	9000.9	9000.9	10000	9000.9
sw1	10000	6000	8000	10500
sw2	1800	1800	12001.2	10498
Demi dwell time	D2/D3	D2/D3	D2/D3	D2/D3
	D1=(^1H), D2=(^{15}N), D3=(^{13}C)	D1=(^1H), D2=(^{15}N), D3=(^{13}C)	D1=(^1H), D2=(^{13}C), D3=(^{13}C)	D1=(^1H), D2=(^{13}C), D3=(^1H)
Matrice	512*128*256	512*128*256	512*256*256	512*256*256

Tableau VIII.4: Paramètres d'acquisitions des expériences 3D utilisées pour l'attribution des chaînes latérales.

VIII.9.3 Attribution des NOEs

Les expériences NOESY permettant d'observer les NOE entre protons amides ont été enregistrées à partir de l'échantillon triplement marqué obtenu à partir de la culture dans le milieu commercial Silantes OD2 CDN (lot EC CDN-0802-28)). L'échantillon, préparé en anaérobiose dans une boîte à gant sous argon, est triplement marqué ^2H , ^{15}N , ^{13}C et à une concentration de 1.5 mM dans du tampon MOPS 100 mM KCl 500 mM DTT 10 mM pH 7.5.

expériences	NOESY-HSQC édité ^1H dans la dimension NOESY	HSQC-NOESY-HSQC édité ^{15}N dans la dimension NOESY	Expérience NOESY méthyles avec découplage homonucléaire
MHz	800	800	800
np (^1H)	1024	1024	1024
ni (NOESY)	90 (^1H)	80 (^{15}N)	100 (^1H)
ni2	80 (^{15}N)	80 (^{15}N)	100 (^{13}C)
mixing (ms)	500	500	80
sw (^1H)	12001.2	12001.2	9000.9
sw1 (NOESY)	5000	2400	4000
sw2	2400 (^{15}N)	2400 (^{15}N)	4000
Demi dwell time	D2/D3	D2/D3	D2/D3
Matrice	512*256*256	512*256*256	512*256*256

Tableau VIII.5 : Paramètres d'acquisitions des expériences 3D utilisées pour l'attribution des NOEs entre protons amides et des NOEs entre méthyles.

VIII.9.4 Mesure des NOEs hétéronucléaires

Les NOEs hétéronucléaires du dimère ($\text{Zn}_5\text{FUR}_\text{D}$) ont été enregistrés à partir d'un échantillon marqué ^{15}N à 2.1 mM dans le tampon MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7.5 DTT 10 mM préparé en boîte à gant sous argon.

Les NOEs hétéronucléaires du monomère (FUR_M) ont été enregistrés à partir d'un échantillon marqué ^{15}N , ^{13}C à 1.9 mM dans le tampon MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7.5 EDTA 20 mM préparé en boîte à gant sous argon.

NOE hétéronucléaires	Dimère	Monomère
MHz	600	600
np (^1H)	1024	1024
ni (^{15}N)	128	128
sw (^1H)	9000.9	9000.9
sw1 (^{15}N)	1800	1800
saturation	4 s	4 s
recyclage	7 s	7s

Tableau VIII.6 : Paramètres d'acquisitions des expériences 2D utilisées pour la mesure des NOEs hétéronucléaires.

VIII.9.5 Mesure des couplages résiduels dipolaires

L'échantillon utilisé pour ces mesures est triplement marqué ^2H , ^{15}N , ^{13}C de Zn_5FUR_D deutéré à 46% et à une concentration de 2.2 mM dans du tampon MOPS 100 mM KCl 500 mM DTT 10 mM pH 7.5.

Deux échantillons ont été nécessaires pour ces mesures :

- un échantillon à 2.2 mM dans le tampon MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7.5 pour les mesures en milieu isotrope (le même ayant servi à l'attribution des résonances).
- un échantillon de protéine triplement marqué deutéré à 46% jusqu'alors conservé à -80°C . Sa concentration est de ~ 2.2 mM dans le tampon MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7.5 contenant un mélange d'alcool C_{12}E_6 /hexanol à 5 % w/v avec un rapport molaire $r=0.64$ pour les mesures en milieu anisotrope.

Pour préparer l'échantillon en milieu anisotrope, 15.5 mg de C_{12}E_6 (Fluka) pesés à froid sont dilués dans 310 μL de solution de protéine à 2.2 mM dans du tampon MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7.5. Ensuite, 7.3 μL d'hexanol sont ajoutés goutte à goutte et l'état de la phase est vérifié à chaque ajout d'hexanol en agitant vigoureusement la solution afin de ne pas dépasser le seuil critique. La formation de la phase lamellaire se voit à l'œil nu. Le mélange passe d'abord par une phase trouble et blanchâtre. A ce stade, il faut encore ajouter de l'hexanol. Lorsque l'on obtient la phase lamellaire, le milieu redevient translucide. Si l'on mélange énergiquement la solution, on observe des bulles d'air qui remontent lentement vers la surface. Le milieu est alors prêt. L'échantillon est transféré dans un tube Shigemi à plongeur. Le plongeur doit être introduit avec précaution afin de ne pas avoir de bulles au niveau de l'interface.

expériences	HNCO $^1D_{NH}$	HNCO $^1D_{COCA}$	HNCO $^1D_{COHN}$
MHz	600	600	600
np (1H)	1024	1024	1024
ni (^{13}C)	100	100	70
ni2 (^{15}N)	50	50	50
sw (1H)	8000	8000	8000
sw (^{13}C)	2263	2200	2000
sw2 (^{15}N)	1800	1800	1800
f2180	oui	oui	oui
f1180	oui	oui	oui
D1(1H)*D2(^{15}N)*D3(^{13}C)	512*128*256	512*128*256	512*128*256

Tableau VIII.7 : Paramètres d'acquisitions des expériences 3D utilisées pour la mesure des couplages dipolaires résiduels.

VIII.10 Spectroscopie RMN sur le monomère

Les résonances des noyaux de la chaîne principale ont été attribuées à partir d'expériences enregistrées avec un échantillon marqué ^{15}N , ^{13}C de FUR_{Mox} et à une concentration de 1.9 mM dans du tampon MOPS 100 mM KCl 500 mM EDTA 20 mM pH 7.5. L'échantillon a été préparé en anaérobie dans une boîte à gant sous argon.

expériences	HNCO	MQ_HNCOCA	MQ_COHNCA	HN(CA)CO	HN(CA)CB	HN(COCA)CB
MHz	600	600	600	600	600	600
np (1H)	1024					
ni (^{13}C)	100	ND	150	100	100	100
ni2 (^{15}N)	50	ND	50	48	48	48
sw (1H)	8000	ND	9000.9	8000	8000	8000
sw1 (^{13}C)	2263	ND	6000	2263	10000	10000
sw2 (^{15}N)	1800	ND	1800	1800	1800	1800
Demi dwell time	D2/D3	ND	D2	D2/D3	D2/D3	D2/D3
D1=(1H), D2=(^{15}N), D3=(^{13}C)						
Matrice	512*128*256		512*128*512	512*128*256	512*128*128	512*128*128
MI_LP(2)	Prédiction linéaire miroir dans la dimension azote					

Tableau VIII.8 : Paramètres d'acquisitions des expériences 3D utilisées pour l'attribution de la chaîne principale du dimère.

VIII.11 Titration du monomère et du dimère par du Zn^{2+} et suivi par RMN

Pour le monomère, 350 μL d'apo monomère doublement marqué $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ à 1,5 mM dans du tampon MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7.5 sont titrés par une solution de ZnSO_4 à 26.2 mM fraîchement préparée dans de l'eau. Différents ajouts de métal de 0 à 0.75 équivalents sont réalisés par pas de 0.25 équivalents. 5 μL de ZnSO_4 à 26.2 mM correspondent à 0.25 équivalents. Le métal est ajouté goutte à goutte en agitant délicatement la solution de protéine afin de limiter la précipitation métal-dépendante. A chaque goutte, un précipité est visible mais se dissout lentement. L'échantillon est laissé à équilibrer 15 minutes dans le spectromètre avant d'enregistrer l'HSQC ^1H - ^{15}N à 600 MHz et à 25°C.

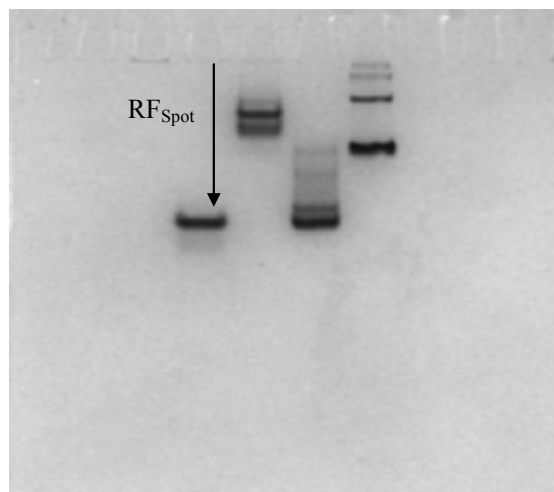
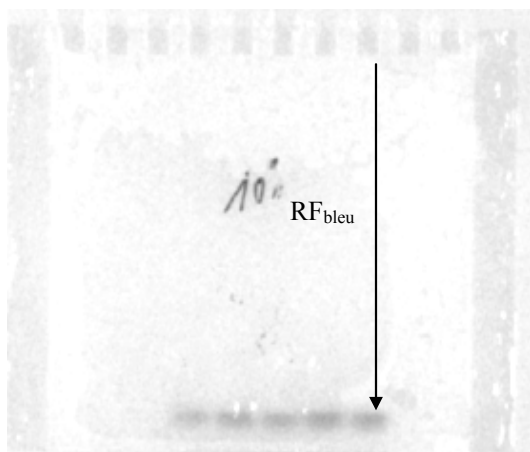
Pour le dimère, 400 μL de Zn_5FUR_D marqué ^{15}N à 1,1 mM dans du tampon MOPS 100 mM KCl 500 mM pH 7.5 sont titrés par une solution de ZnSO_4 à 45 mM fraîchement préparé dans de l'eau. Différents ajouts de 0 à 2 équivalents sont réalisés par pas de 0.5 équivalents. 5 μL de ZnSO_4 à 26.2 mM correspondent à 0.5 équivalents. Le métal est ajouté goutte à goutte en agitant délicatement la solution de protéine afin de limiter la précipitation métal-dépendante. Un précipité est visible mais se dissout lentement. L'échantillon est laissé à équilibrer 15 minutes dans le spectromètre avant d'enregistrer l'HSQC ^1H - ^{15}N à 600 MHz à 298 K.

VIII.12 Détermination de la stoechiométrie protéine/ADN par EMSA

Le milieu réactionnel est constitué d'un excès de protéine par rapport à l'ADN de 15. 50 nM d'ADN consensus sont incubés en présence de 0.75 μM de Zn_5FUR_D (en concentration de dimère) ou de 0.75 μM de FUR_{Mox} . L'incubation est réalisée dans un volume final de 10 μL dans le tampon BisTris Borate à 10 mM pH 7.5, MgCl_2 à 1 mM, MnCl_2 à 0.1 mM pendant 15 minutes à 37°C. Après l'incubation, 2 μL de solution de bleu non dénaturante sont ajoutés. 3 μL d'échantillon sont prélevés et déposés sur le gel. Le reste des échantillons peut être conservé à -20°C.

Le gel est polymérisé dans le tampon BisTris Borate à 10 mM MnCl_2 à 0.1 mM pH 7.5. Une pré-migration de 2h à 200V en chambre froide est réalisée sur le gel dans le même tampon que le tampon d'incubation. Après dépôt des échantillons, le gel est mis à migrer en chambre froide jusqu'à la limite de sortie du front de migration. Le bleu ne doit pas sortir du gel afin de pouvoir mesurer la distance parcourue par le front de migration.

Le rapport frontal RF est calculé de la manière suivante : $\text{RF} = (\text{RF}_{\text{spot}} / \text{RF}_{\text{bleu}})$ où RF_{spot} est la distance entre le bas du puit et le milieu de la bande et RF_{bleu} la distance entre le bas du puit et le milieu de la bande de bleu.



Après avoir réalisé une série de gel de 5 à 10% d'acrylamide, les RF calculés sont reportés dans un graphe de $100\text{Log}(\text{RF} \times 100) = f(\% \text{acrylamide})$. Les points obtenus sont ajustés par régression linéaire et la valeur de pente est comparée à la courbe étalon réalisée à partir de protéines de poids moléculaire connu. La masse du complexe peut ainsi être déterminée.

Références bibliographiques

1. 1994. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50: 760
2. Adrait A, Jacquamet L, Le Pape L, Gonzalez de Peredo A, Aberdam D, et al. 1999. Spectroscopic and saturation magnetization properties of the manganese- and cobalt-substituted Fur (ferric uptake regulation) protein from Escherichia coli. *Biochemistry* 38: 6248
3. Bagg A, Neilands JB. 1987. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in Escherichia coli. *Biochemistry* 26: 5471
4. Emsley P, Cowtan K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60: 2126
5. Kabsch W. 1993. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* 26: 795
6. Laskowski RA. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26: 283
7. Perrakis A, Harkiolaki M, Wilson KS, Lamzin VS. 2001. ARP/wARP and molecular replacement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57: 1445
8. Read RJ, al. e. 2001. Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57: 1373
9. Roth M, Carpentier P, Kaikati O, Joly J, Charraut P, et al. 2002. FIP: a highly automated beamline for multiwavelength anomalous diffraction experiments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58: 805
10. Wee S, Neilands JB, Bittner ML, Hemming BC, Haymore BL, Seetharam R. 1988. Expression, isolation and properties of Fur (ferric uptake regulation) protein of Escherichia coli K 12. *Biol Met* 1: 62

Annexe A

Tuning of *E. coli* Fur activity by a thiol/disulfide switch and zinc-dependent dimerization

Benoît D'Autréaux[‡], Ludovic Pecqueur^{‡,§}, Anne Gonzalez de Peredo[#], Rutger E.M. Diederix[‡], Christelle Caux-Thang[‡], Lyes Tabet[‡], Beate Bersch[§], Eric Forest[#] and Isabelle Michaud-Soret^{‡*}

[‡] Laboratoire de Physicochimie des Métaux en Biologie (UMR 5155 CNRS/CEA/UJF), Département Réponse et Dynamique Cellulaires, CEA-Grenoble, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France [#] Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines and [§] Laboratoire de RMN des Protéines, Institut de Biologie Structurale, Jean-Pierre Ebel (UMR 5075 CNRS/CEA/UJF), F-38027 Grenoble Cedex 1, France

Running Title: Oligomerization properties of *E. coli* Fur

Address correspondence to: Isabelle Michaud-Soret, Laboratoire de Physicochimie des Métaux en Biologie, Département de Réponses dynamique et cellulaire, CEA-Grenoble, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France , Tel. (33) 4 38 78 99 40; Fax. (33) 4 38 78 34 62; E-mail: imichaud@cea.fr

Fur is a bacterial regulator using iron as a cofactor to bind to specific DNA sequences. Fur coordinates the response to several stresses with the regulation of iron metabolism but the underlying mechanisms are poorly understood. Fur exists in solution as one of several oligomeric states, of which the dimer is generally assumed to be the biologically relevant one. We describe the equilibria that exist between dimeric *E. coli* Fur and higher oligomeric states. The dissociation constant for the dimer-tetramer equilibrium is estimated in the millimolar range, but depends on pH and ionic strength. In contrast to the dimer, the as-isolated monomeric form of *E. coli* Fur contains two disulfide bridges (Cys92-Cys95 and Cys132-Cys137). Binding of the monomer to DNA is metal-dependent and sequence specific with an apparent affinity 5.5 times lower compared to the dimer. Dimerization of the monomer is observed by exclusion chromatography in presence of reductant (DTT) and Zn²⁺ and confirmed using carbodiimide and imidoesters in chemical crosslinking experiments. Analysis of the crosslinked species revealed interactions between the N-terminal NH₂ of one monomer and Lys76, Lys97 or the C-terminal part of the other monomer. The crosslink yield is lowered on metal activated dimer.

Interestingly, reaction with an oxidizing reagent, H₂O₂ or diamide, disrupts the dimer into monomer. These results suggest that the thiol/disulfide switch and zinc-dependent dimer/monomer inter conversion provides a tuning of Fur activity in response to oxidative stress. A similar mechanism is proposed for the redox sensing Fur-like proteins FurA, CatR, FurS and PerR.

Introduction

Fur (Ferric Uptake Regulation) is a global regulator ubiquitous in *Gram* negative bacteria which controls the expression of more than 90 genes in *Escherichia coli* (1). This dimeric protein (2x17 kDa) was initially described as a key protein for the control of the intracellular iron concentration (2-4). When the cellular iron concentration becomes high enough, the Fur repressor binds ferrous iron, its corepressor, which activates its DNA binding activity to specific DNA sequences called "iron-box", leading to transcriptional repression of genes involved in iron uptake (5,6). The role of Fur is not only linked to the availability of iron but also to the response to various stresses in which iron is intimately involved. For instance, Fur is involved in response to oxidative (4), nitrosative (7-9) and acid stress (10,11).

The Fur protein appears mainly as a dimer in solution according to HPLC experiments (12) and mass spectrometry data (13). Complementation experiments with inactive mutants suggest that the active form of Fur is at least a dimer *in vivo* (14). Furthermore, the free protein as well as the protein bound to DNA are able to oligomerize in a pH dependent way as observed by electron microscopy (15,16). The polymerization on DNA may be linked to the tuning of the regulation response by Fur (17).

The first X-ray structure of a Fur protein has been reported recently, with the Fur protein of *Pseudomonas aeruginosa* (18). The protein has been crystallized, in presence of excess of zinc, as a homodimer. The structure shows that the protein contains a winged helix turn helix DNA binding motif and a dimerization domain. As expected from previous extensive spectroscopic studies of *E. coli* Fur (19-21), two relevant metal binding sites were identified in the crystal structure: a regulatory site responsible for activation of the DNA binding activity and a purported structural zinc site. In the regulatory site, the zinc ion is hexacoordinated in an octahedral geometry, with a water molecule occupying one of these positions. The spectroscopic data (EPR, Mössbauer, X-ray absorption) obtained with the iron-containing form of *E. coli* Fur, the physiologically relevant form, are in agreement with the crystallographic structure, indicating that the structure of this site may be very similar when iron is bound (21). The structural site in *P. aeruginosa* Fur contains a zinc ion in a tetrahedral geometry coordinated by two histidines (His32 and 89) and two glutamates (Glu80 and 100). In contrast, for *E. coli* Fur, EXAFS studies showed that the zinc ion is coordinated by two cysteines and one or two aspartate or one histidine and one aspartate (19). The two cysteines, Cys92 and Cys95, have been identified as ligands of the zinc atom using chemical modification and mass spectrometry (22). These cysteines are conserved in a large number of Fur proteins but only one is conserved in *P. aeruginosa* Fur. Although the zinc site probably plays a structural role, to date no clear function of this zinc site has been elucidated.

In this work, we focus on the characterization of the different oligomeric forms of the Fur protein from *E. coli*. The oligomeric properties of Fur are described, as a function of ionic strength and pH. Furthermore,

we propose a role for the structural zinc, which appears to be essential for dimerization of *E. coli* Fur in a redox dependent manner. Crosslinking experiments allow to identify amino acids of the Fur protein involved in inter-subunit contacts. Altogether, these data allow us to progress in the understanding of the structural properties of the Fur protein in solution that are potentially linked to the response to various types of stress, especially acid stress and oxidative stress.

Materials and Methods

Chemicals. Trizma, Bis-Tris Propane, MOPS and Mes buffers, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), triethanolamine, 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC), Dimethyl adipimidate (DMA), diamide, ZnSO₄ were purchased from Sigma/Aldrich. Chymotrypsin, endoproteinase Lys-C and endoproteinase Glu-C were purchased from Boehringer Mannheim. Immobilized pepsin was purchased from Pierce.

Overproduction and Purification of Fur. Fur was overproduced and purified as previously described (23) but with some modifications (7). A higher yield in monomeric Fur can be obtained by increasing the EDTA concentration in the extraction buffer to 100 mM. The samples collected from the gel filtration (Superdex 75 from Amersham Biosciences) were concentrated in 100 mM Tris/HCl containing 100 mM KCl and 10 % v/v glycerol at pH = 8. Protein concentrations, consistently expressed in subunit concentration unless indicated otherwise, were determined spectrophotometrically using an absorption coefficient of 0.4 mg⁻¹mL⁻¹cm⁻¹ at 275 nm for one monomer of pure native Fur (23).

Analysis of oligomeric forms by gel exclusion chromatography. The effects of protein concentration, pH and KCl concentration on the oligomerization of Fur were monitored by analytical exclusion chromatography (Superdex 75 10/30 Amersham Biosciences) using an FPLC system at a flow rate of 1 mL/min at 4°C. The relative amount of each oligomer was measured by integration of the area under the curve (absorbance at 280 nm) using GraphPad Prism software and a Gaussian model to resolve overlapping peaks. The data were then analyzed according to a method derived from Manning *et al.* (24) in order to obtain the equilibrium

constant for tetramer dissociation, K_{tet} (see supplementary material). The molecular weights were estimated using a molecular weight calibration kit (Amersham Biosciences). The solutions of protein to be analyzed were prepared as described below.

Influence of protein concentration. A solution of dimer in 0.1 M MOPS pH = 7.5, containing KCl at 0.1 M, was concentrated at 3 mM using Ultrafree 0.5 (Millipore) and was diluted at 1.5 mM, 1.0 mM, 0.5 mM and 0.2 mM with the same buffer. The solutions were allowed to equilibrate 6 h at 25°C.

Influence of KCl concentration. Three samples were prepared at various KCl concentrations. A solution of concentrated dimer (3 mM in 0.1 M MOPS pH = 7.5, KCl 0.1 M) was diluted two times in 0.1 M MOPS pH = 7.5, containing KCl at 0.1 M, 1 M and 2 M. The three solutions were allowed to equilibrate 6 h at 25°C.

Influence of pH. Solutions of Fur protein at pH = 6.5, 7.0, 8.0 and 9.0 were prepared from the same stock solution of dimer. Samples of the stock solution (500 μ L, 250 μ M in 0.1 M Tris/HCl pH = 8, containing KCl at 0.1 M) were loaded on a Sephadex G-25 column (Amersham Biosciences) equilibrated with 0.1 M Bis-Tris propane pH = 6.5, 7, 8 or 9 and containing KCl at 0.1 M. Various protein concentrations (240 μ M, 180 μ M, 120 μ M, 60 μ M, and 20 μ M) were obtained by dilution of the resulting solutions (500 μ L, 250 μ M) in the corresponding buffer and the final solutions were allowed to equilibrate for 10 h at 4 °C.

Monomer to dimer conversion. To avoid artifactual effects caused by metal contamination, high concentrations of protein were used in these experiments. The monomer at 1.9 mM in 0.1 M Tris/HCl pH = 8 containing 0.1 M KCl was incubated in the presence of DTT and/or ZnSO₄ at 25°C for 10 min or 1 h before being loaded to the column equilibrated with the same buffer.

Oxidation state of thiols in the monomer. Alkylation of the thiol groups of the monomer was performed as previously described for the dimer (22). The dimer (50 μ M) and the monomer (50 μ M) in 0.1 M Tris/HCl pH = 8, 0.1 M KCl, 50 mM EDTA were treated with freshly prepared iodoacetamide (6 mM) during 24h. The proteins were then desalted using a C₄ ZipTip column (Millipore) in 10 mM ammonium acetate buffer and analyzed by

electrospray mass spectrometry. EndoproteinaseLysC digestions were performed with 1 % (w/w) of endoproteinaseLys-C during 6 h in 100 mM ammonium bicarbonate buffer at pH = 7.9 on a 25 μ M monomer sample before MALDI analysis.

EDC crosslinking. The reaction was performed with a protein concentration of 1 mg/ mL (40 μ M) (25-27). The Fur monomer and dimer samples were incubated in 20mM MOPS pH = 7 containing 150mM KCl, in presence of: 10 equivalents/subunit DTT, 100 equivalents/subunit EDTA and various equivalents/subunit of metal ion sulfate (1, 10 and 100) as indicated in the Figure 4. After 5 min of incubation with above-mentioned reagents, the buffer was either treated with EDC without exchange (Figure 4B, lanes 6 -10) or either exchanged (Microbiospin, Biorad) to 20 mM MES buffer at pH = 6.5 containing 0.15 M KCl (Figure 4 A lanes 2-9 and B lanes 2-5) and subsequently incubated for 1 h with 20 mM EDC. Fresh solution of EDC was prepared each time (in the same buffer) and the incubations with EDC were performed at room temperature in the dark. After denaturation at 95°C for 15 min in presence of β -mercaptoethanol and SDS, the samples were loaded on 17 % polyacrylamide gels.

Concentrations of reagent and protein were chosen to obtain a yield of crosslinked dimer reaching roughly 40 to 50 % of total protein. For mass analyses, the reaction was performed in 20 mM Mes pH = 6.5, 150 mM KCl and the reagent was removed by dialysis after the incubation, and the protein was then treated with hydroxylamine, in order to hydrolyze the O-acyl isourea groups resulting from the fixation of EDC on unreacted carboxylates (25-27). Crosslinked dimer and unreacted monomers were separated using reversed phase HPLC on a C₄ Brownlee column (2.1 mm x 150 mm, Applied Biosystems) (data not shown). Solvent A was a solution of 0.1 % trifluoroacetic acid in water, and solvent B was a 90/10/0.08 acetonitrile /water/ trifluoroacetic acid mixture. The column was equilibrated in 10 % solvent B, and the species were separated with a slow gradient of solvent B in A (10 % to 40 % in 30 min, then 40 % to 55 % in 15 min).

Analysis of peptides crosslinked with EDC. Fractions containing the crosslinked dimer were dried with a Speed-vac concentrator and dissolved in 100 mM ammonium acetate (pH =

7.5) for proteolytic cleavage. About 1% w/w endoproteinase Lys-C was added to each of them, and the mixture was incubated at 37°C overnight. Resulting peptides were analyzed by MALDI-TOF-MS. For further characterization of the crosslinking site, peptides were separated by reversed phase HPLC on a C18 Brownlee column (1 mm x 150 mm, Applied Biosystems). Solvents A and B were the same as described above. The gradient used was as follows: 0 % to 30 % of solvent B in 100 min, then 30 % to 80 % in 40 min. Fractions were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry and the fractions containing the crosslinked peptides were dried and dissolved in 100 mM ammonium acetate (pH = 7.5) for further cleavage of the C-terminal peptide with chymotrypsin. About 1 % w/w of enzyme was added and the mixture was incubated during 6 h at 37°C. Resulting peptides were separated using the following gradient: 2 % to 32 % of solvent B in 70 min, then 32 % to 82 % of solvent B in 30 min. After MALDI-TOF-MS analysis of the fractions, one of them was shown to contain the digested crosslinked peptides and was thus treated with cyanogen bromide for further cleavage after the methionine of the N-terminal peptide. The fraction was dried and then dissolved in 70 µL of pure TFA before addition of 30 µL of water and 1 mg of cyanogen bromide. The mixture was incubated overnight at 5°C, then dried, dissolved in water and analyzed by MALDI-TOF-MS.

DMA crosslinking

The reaction was performed in 200mM triethanolamine buffer (pH = 8.5), at a protein concentration of 1 mg/mL (60 µM monomer). Dimethyl apimidate was freshly prepared in the same buffer and added to a final concentration of 50 mM. The mixtures were incubated for 30 min at room temperature, then immediately frozen in liquid nitrogen. Purification and separation of monomer and crosslinked dimer were performed by reversed phase HPLC as described in the case of EDC crosslinking.

Analysis of peptides after treatment with DMA
Fractions containing the monomer or the crosslinked dimer were dried and redissolved in 100 mM ammonium acetate buffer (pH = 7.5) for proteolytic cleavage. About 1% w/w endoproteinase Glu-C was added, and the mixture was incubated at 25°C overnight. Resulting peptides were separated by HPLC on a C18 reversed phase column (1 mm x 150 mm,

Applied Biosystems). Solvent A and solvent B were the same as previously described. The gradient used was 0% to 60% of solvent B in 60 min. For detection of crosslinked peptides, fractions were analyzed by MALDI-MS.

Mass spectrometry analysis. Electrospray mass spectrometry of peptides and proteins was performed using a SCIEX API III + triple quadrupole mass spectrometer (Perkin-Elmer Sciex) equipped with a nebulizer-assisted electrospray source. Poly(propylene glycol) ions were used for calibration in positive mode. The ion spray voltage was set at 5000 V, the orifice voltage at 80 V, and the interface temperature at 55°C. Measurement of dimeric and oligomeric species was performed with an electrospray-TOF (Time of Flight) mass spectrometer (Micromass, Manchester), under non denaturing conditions. MALDI-TOF mass spectrometry of peptides was performed on a Perseptive Voyager XL (Perseptive Biosystems) time-of-flight mass spectrometer. A solution of 2,5-dihydrobenzoic acid in water/acetonitrile/TFA (50/50/0.1) was used as matrix. A volume of 1 µL of crude peptide mixture was mixed on the target with an equal volume of matrix, and the drop was allowed to air dry. Spectra were acquired in linear mode.

DNA binding monitored by fluorescence anisotropy. Site-specific DNA binding of Fur monomer and dimer was determined using fluorescence anisotropy. 5'-Fluorescein labeled single-strand DNA (Fl-5'-gggGATAATGATAATCATTATCggg-3') and its non-labeled complementary strand were purchased from Sigma Genosys (UK). Both strands were annealed using standard methods and the presence of at least 90 % duplex DNA was confirmed by PAGE. The change in fluorescence anisotropy of the labeled DNA upon binding of Fur species was followed using a thermostated Perkin-Elmer LS50B fluorimeter, with manufacturer's modifications for fluorescence polarization measurements. The settings for optimal fluorescence yield were used as follows: excitation 494 nm (slit 2.5 nm), emission 527 nm (slit 20 nm) with a 515 nm cutoff filter. The g-factor was regularly checked and was always very close to 1.00, and this value was thus used in all anisotropy calculations (using the manufacturer's software). The fluorescence yield of the duplex was not significantly affected during the Fur titrations.

Measurements were performed at 25 °C using a 1 cm by 1 cm, 3 mL stirred cell. Routinely 2.2 mL of 10 nM labelled DNA was used, in 20 mM MOPS pH = 7, KCl 150 mM, and in the presence of 10 µg/mL poly-dIdC (Amersham Biosciences) and 12 mM MgSO₄ to exclude non-specific binding. In some of the experiments, 1 mM MnSO₄ was present, to activate Fur for DNA binding. Binding curves were analysed using the Hill equation:

$$r = r_0 + \Delta r \frac{[\text{Fur}]^n}{K_{1/2}^n + [\text{Fur}]^n} \quad \text{eq. 1}$$

wherein r represents the anisotropy of the DNA, r_0 the anisotropy of unbound DNA and Δr the change in anisotropy upon binding. $K_{1/2}$ is where 50 % of the DNA is bound, and n is the Hill coefficient, a factor that represents the cooperativity of binding.

CD spectroscopy. Far-UV CD spectra (190-250 nm) of oxidized and reduced Fur monomers, reduced monomer titrated with 0.3 to 1.3 equivalents of zinc as well as of pure Fur monomer and dimer, were recorded on a Jasco J-810 spectropolarimeter at 25°C. A 1 mm path length cell was used for the measurement, and the parameters were set as follows: bandwidth, 4 nm; step resolution, 0.5 nm; scan speed, 100 nm/min; and response time, 2 s. Each spectrum was obtained as the average of 4 scans. The protein concentration was typically around 20 µM. Prior to the calculation of the mean residue molar ellipticity, all of the spectra were corrected by subtracting buffer contributions.

Dimer to monomer conversion. Samples of dimeric Fur at 20 µM in 0.1 M Tris/HCl pH = 8 containing 0.5 M KCl were incubated at 25°C under stirring in presence of 2 mM of oxidative reagent (H₂O₂ or diamide). The effect of a concomitant addition of EDTA at 2 mM was also checked. Aliquots were taken after various times of incubation (0, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h and 24 h), and subsequently analyzed by analytical exclusion chromatography.

Results

Oligomerization studies

The Fur protein appears to exist mainly as a dimer in solution as previously shown from HPLC studies (12) and mass spectrometry (13).

Nevertheless, we observed by gel exclusion chromatography (Fig. 1) and mass spectrometry (Fig. 2) that the dimeric form is involved in several oligomeric equilibria depending on protein concentration, KCl concentration and pH. The elution profiles of gel exclusion chromatography experiments presented in Figure 1A and 1B were obtained after 6 h of incubation at 25 °C when the oligomerization reached equilibrium. The chromatograms presented in Figure 1A, obtained after injection of different concentrations of Fur, display species eluting at 10.3 mL, 8.9 mL and 8.3 mL associated to molecular weight of 39 kDa, 66 kDa and 87 kDa and consistent with dimer, tetrameric and hexameric or octameric species, respectively. When the fractions containing the tetramer and the hexamer/octamer were collected, concentrated and re-injected on the gel filtration column a substantial amount of dimer was eluted, indicating that oligomerization of the dimer is reversible (not shown). Mass spectrometry measurements performed under soft non-denaturing conditions showed a major form corresponding to a dimer, plus two different oligomeric forms corresponding to tetrameric and hexameric species (Fig. 2A), in agreement with the results of gel exclusion chromatography. The exact mass calculated for the dimeric form was consistent with the presence of two zinc atoms per dimer (Fig. 2B).

When the concentration of KCl was increased, the oligomerization equilibrium was shifted in favor of the dimer, even at high protein concentration such as 1.5 mM (Fig. 1B). Fur was eluted mainly as a dimer at pH = 9.0, 8.0 (not shown) and 7.0 (Fig. 1D). In contrast, oligomerization was enhanced when the pH was decreased below pH = 7 (Fig. 1C and 1D). The equilibrium constant for the dimer-tetramer equilibrium was determined according to Manning *et al.* (24), but modified to take into account the equilibrium between tetramer and higher oligomers (Fig. 1E). Equilibrium constants for tetramer dissociation of 0.72 ± 0.02 mM and 5.0 ± 0.1 mM at pH = 6.5 and pH = 7 respectively, were obtained at 4°C in 0.1M BTP, 0.1M KCl (Fig. 1E).

Another species eluted at 11.3 mL, corresponding to a monomeric species ($MW_{app} = 23$ kDa), appeared after a relative long incubation time. A monomeric species is also usually co-isolated during Fur purification (see the Materials and Methods section). When the monomer containing fractions were collected,

concentrated and re-injected on the gel filtration column a single elution peak at 11.3 mL was obtained (data not shown), ruling out that the monomer is in a simple or fast equilibrium with the dimer as described above for the oligomerization of the dimer (13).

Oxidation state of thiols in the as-isolated monomeric form

We had already noticed that the presence of excess amounts of EDTA during Fur purification leads to an increased percentage of monomeric Fur (not shown). This suggested the involvement of a metal site in the dimerization process. In the dimeric form of *E. coli* Fur, the zinc ion coordinates the two cysteines 92 and 95 by their sulfur atom (22). The free thiol content of the monomer was analyzed by cysteine alkylation using iodoacetamide under non-denaturing conditions and mass spectrometry analyses (as previously described for the dimer (22)). The results were compared to those obtained for the dimer in presence of EDTA, what was shown to accelerate the alkylation of Cys92 and Cys95. Alkylation of all four cysteines in the dimer demonstrated that the cysteines were not oxidized in dimeric Fur. In contrast, none of the cysteines in the monomer reacted with iodoacetamide. On this form, alkylation of the four cysteines could only be achieved in presence of DTT. These results indicate that all four cysteines were oxidized in the as-isolated monomeric species. (Table S1 in supplementary material).

Subsequently, the oxidized monomer was digested with endoproteinase Lys-C and the peptides were analyzed using MALDI mass spectrometry in order to identify the modification of the cysteines. Two distinct peptides, bearing Cys92 and Cys95 (fragment 78-98) on one hand and Cys132 and Cys137 (fragment 118-148) on the other hand were identified, showing that no disulfide bridge was formed between either cysteine of these two groups (Table S2 in supplementary material). Both peptides had a molecular mass 2 Da lower than expected from the peptide sequence. After incubation of the monomer with DTT, the mass was exactly as expected (Table S2 in supplementary material). This suggests that the oxidized monomer digested by endoproteinase Lys-C contains two disulfide bridges, one between Cys92 and Cys95 and another one between Cys132 and Cys137. It has to be

noticed that a mass deviation of 2 Da was also measured in the peptide containing Cys132 and Cys137 after digestion of the dimer (see crosslink experiments), although in this species these residues are not initially oxidized. Therefore, by itself this mass deviation is not indicative of a disulfide bond in the protein as it can be attributed to oxidation under the conditions used for enzymatic digestion. However, alkylation experiments with iodoacetamide, performed on the native protein itself, clearly show that the cysteine residues in the monomeric species are completely unavailable for reaction. Altogether, these data indicate the presence of two disulfide bridges in the as-isolated monomer.

Monomer to dimer conversion

Monomer and dimer are not in a simple equilibrium as mentioned above. However, having shown that the sulfur atoms that are normally bound to the zinc ions are involved in a disulfide bridge in the monomer, we assessed the effect of reductant (DTT) and zinc ions on the oligomeric structure of the monomer. Figure 3 shows chromatograms obtained after treatment of the monomer with DTT and addition of a stoichiometric amount of zinc. We observed that addition of zinc and DTT leads to formation of dimer in less than 10 minutes (Fig. 3A). Interestingly, this process was faster when DTT was added first than when zinc was added first (data not shown). When zinc ion was added one hour after addition of DTT, the yield in dimer was decreased by approximately 50 % (Fig. 3B) compared to a situation in which it was added only 10 minutes after DTT. This suggests an air-oxidation of the thiols. In contrast, neither reduction of the thiolates (Fig. 3C) nor addition of a stoichiometric amount of zinc alone (Fig. 3D) leads to dimerization. The addition of other dications, such as Co^{2+} or Mn^{2+} , instead of zinc, also led to the formation of a dimer in the presence of DTT (data not shown).

Crosslink experiments

Crosslinking reactions have been widely used to study protein-protein interactions and to prove interaction or proximity between several protein components in a complex (25-27).

Crosslinking with ethylene carbodiimide

Covalent crosslinking using ethylene carbodiimide (EDC) allows to form covalently bound dimer and to characterize the ionic interaction involved in the dimeric quaternary

structure stabilization by mass spectrometry analysis after partial proteolysis. EDC activates the carboxylate groups of proteins, allowing them to react by nucleophilic substitution with close amines resulting in formation of an amide bond. It is thus called a "zero-length crosslinker", as it converts an ionic interaction between the two residues into a covalent bond (25-27). The yield of the crosslinking reaction was estimated by SDS-PAGE. EDC treated Fur dimer samples gave a clear band corresponding to a species with a molecular weight of 34 kDa on the gel in addition to the 17 kDa band normally observed for denatured Fur, indicating that the major reaction product was actually a crosslinked dimer (Fig. 4B, lane 2). It is noteworthy that DTT and EDTA have no effect on the EDC crosslink yield of the dimer (Fig. 4B, lanes 3-5). In contrast, no band corresponding to dimeric Fur was observed after EDC treatment of the monomer (Fig. 4A, lane 2). However, when monomer samples were pre-treated with DTT or zinc, we clearly observed a small amount of crosslinked dimer (Fig. 4A, lanes 5 and 6). Pre-treatment using both reagents simultaneously appeared most efficient (Fig. 4A, lanes 7). When EDTA was added to the reaction with DTT only, the crosslinked species was not observed, indicating that some metal contaminants in our solutions may play the role of the zinc ions (Fig. 4A, lane 3 and 4). Considering the importance of DTT for dimerization, it is likely that the crosslinking observed in the absence of added DTT (Fig. 4A, lane 5) is caused by the presence of some reduced monomer in the samples. When Mn^{2+} was used instead of Zn^{2+} (Fig. 4A, lane 8 and 9) formation of the crosslinked species was also observed in presence of DTT, but the yield was much lower. We then used the chemical crosslink reaction to monitor eventual conformational changes after metal-activation of the protein. When manganese ions were added to the dimeric form to generate the activated-dimer (MnFur dimer) the yield of crosslink was drastically decreased for $[Mn^{2+}]/[Fur]$ ratios of 10 and 100 (Fig. 4B, lanes 6 to 9). In the same proportion magnesium (unable to activate the Fur protein (7)) does not alter the crosslinking yield (Fig. 4B, lane 10). According to the different values of K_d (Mn^{2+}/Fur) reported in the literature: 20 μM (28), 80 μM (29) and 85 μM (30), 20-50 % of the dimeric protein would be loaded with Mn^{2+} for a ratio of 1 and 85-100% for ratios > 10. These results suggest that the

inter-monomer ionic interaction resulting in the EDC crosslinking is lost upon metal binding.

In order to identify the amino acids involved in the crosslink, the protein was successively digested. The isolated dimeric crosslinked or not crosslinked monomeric species were first digested with endoproteinase Lys-C, and the crude peptide mixture was analyzed using MALDI-TOF-MS. Figure 5 shows the spectra of these two mixtures, with peaks corresponding to the singly charged ions of the peptides. The peak at m/z 3547 corresponds to the C-terminal peptide H117-K147. A mass deviation of 2 Da from the theoretical value of m/z 3549 was observed for this peptide, and can be attributed to disulfide bridge formation between the two cysteines Cys132 and Cys137 under the conditions used for enzymatic digestion. Interestingly, new peaks at m/z 4406 and 4537 appeared in the peptide map of the crosslinked dimer, which may correspond to crosslinked peptides. The masses measured were consistent with species composed of the C-terminal peptide (H117-K147) of one monomer crosslinked to the N-terminal peptide of the other monomer, after elimination of one water molecule during the crosslinking reaction. Furthermore, the intensity of the peak at m/z 3547, corresponding to the free form (H117-K147), was reduced in the peptide map of the crosslinked dimer, in agreement with (H117-K147) being involved in a crosslink. Two signals were detected for the crosslinked peptides, with a mass difference of 131 Da. As the N-terminal methionine of the protein is normally not completely excised during over-expression, the crosslinked N-terminal peptide can be either T1-K8 or MT1-K8, in agreement with a mass difference of 131 Da corresponding to the N-terminal methionine (13).

The crosslinked peptides were subsequently isolated using reversed phase HPLC, and the different forms of the C-terminal peptide, free, crosslinked with T1-K8 and crosslinked with MT1-K8 were successively eluted and identified by MALDI-TOF-MS. The crosslinked peptides were digested by chymotrypsin (Fig. 6). This allowed us to find that only the fragment L128-K147 and not H117-Y127 was crosslinked to T1-K8 and to MT1-K8. Edman degradation of both species gave a sequence in which amino acids Glu139, Asp140 and Glu145 were missing from the L128-K147 moiety, suggesting that one or

several of these residues were involved in the crosslink. No sequence was obtained for T1-K8 and MT1-K8, indicating that the N-terminal NH₂ of this moiety was not available and thus probably involved in the crosslink. The peptide corresponding to L128-K147 crosslinked to MT1-K8 was treated with CNBr to allow cleavage after the methionine. Mass determination of the resulting peptide by MALDI-MS gave a peak at *m/z* 2341, consistent with peptide L128-K147 still linked to the N-terminal methionine, after release of T1-K8. This confirmed that the crosslink took place between the N-terminal NH₂ of one monomer, and one of the glutamate or aspartate residues (Glu139, Asp140 and Glu145) located in the C-terminal end of the other monomer.

Crosslinking with imidoesters

DMA is an homobifunctional imidoester that specifically reacts with the primary amines of the protein and can crosslink amino groups located at less than 8.6 Å one from each other. It thus allows to identify close residues in the 3 dimensional structure. After reaction of the protein with the crosslinker, the covalent dimer was isolated from non-linked monomers by HPLC, and both species were then submitted to proteolytic cleavage with endoproteinase Glu-C. In both cases, resulting peptides were isolated by HPLC and each fraction was analyzed by mass spectrometry in order to identify crosslinked peptides resulting from intermolecular linkage of the two monomers. In two fractions, MALDI-MS analysis gave signals that were detected in the case of the covalent dimer but not for the non-linked monomers. These fractions contained the N-terminal peptides of the protein, with or without N-terminal methionine, T1-E23 or MT1-E23). The spectrum of the fraction containing peptide T1-E23, gives a singly charged ion at *m/z* 2538 (Figure S1 in supplementary material). The intact peptide is present in the case of either the non-linked monomers or the covalent dimer, with mass adducts of 126 Da corresponding to fixation of a DMA molecule on one or several of the four lysines of the peptide or on the N-terminal amino group. However, in the case of the covalent dimer, new species are detected at higher masses. The peak at *m/z* 3369 is consistent with a crosslink occurring between the N-terminal peptide T1-E23 of one monomer and peptide G74-E80 of the other monomer. This later peptide contains only one lysine, Lys76, which must thus be involved in the

crosslinking reaction. Another crosslink involving the N-terminal peptide of one monomer and peptide L81-E100 of the other monomer, which contains only Lys97, could be detected in a second HPLC fraction. Therefore, Lys76 and Lys97 of one monomer seem to be located less than 8.6 Å away from one or several amino groups belonging to the N-terminal part of the other monomer. The comparison of crosslinking experiments on the apoFur and the metal-activated, manganese-bound Fur dimer was performed. In each case, the covalent dimer obtained after reaction with dimethyl adipimidate was separated from non-linked monomers by HPLC, allowing measurement of the crosslinking yield (data not shown). With the metal activated protein, the reaction yield decreased almost of 50% suggesting that metal binding causes an increase of the distance between the amino acids of each monomer involved in the crosslinking.

Secondary structure changes followed by circular dichroism

The results presented in Figure 7 show that addition of DTT does not affect the secondary structure of the monomer. Addition of zinc to the reduced monomer quantitatively results in formation of a species indistinguishable in secondary structure from the dimer (Fig. 7A and insert). CD spectroscopy confirmed that both zinc and DTT were required for the formation of the dimer from the oxidized monomer, and furthermore that the secondary structures of the dimeric species formed in this way and of the as-isolated dimer were identical. The CD spectra of both monomeric and dimeric Fur indicate a mixed α/β secondary structure with a significant degree of α -helical structure, in agreement with the *P. aeruginosa* Fur dimer structure (42% of α -helices) (18). The difference spectrum of the dimer and monomer (Fig. 7B) indicates a change in secondary structure composition upon dimerization of Fur. The decrease in negative ellipticity between 200 and 207 nm, and around 227 nm, most likely indicates a relative increase in the fraction of β -sheet over α -helix upon dimerization. The difference in ellipticity between both types of secondary structure is largest in these wavelength regions. However, the change in the 220-240 nm region can also be associated to a change of the environment near aromatic residues, especially tyrosine (31,32).

DNA binding activity of monomeric and dimeric Fur

The DNA binding activities of Fur dimer and monomer were determined by fluorescence anisotropy. We used a fluorescein-labelled 25 bp oligonucleotide containing the 19 bp consensus Fur box sequence (the most simple motif known to undergo *in vivo* regulation (6)). Three GC bp were added on both sides of the Fur box to improve the duplex stability and avoid hairpin formation. Binding studies were performed as a function of Fur concentration. For both forms, clear binding was observed only in the presence of Mn^{2+} (Fig. 8). Addition of excess EDTA to solutions containing 1 mM $MnSO_4$ led to immediate lowering of the fluorescence anisotropy to the initial value for both dimeric and monomeric Fur (not shown). In all cases, the Fur titrations were performed in the presence of excess (10 $\mu g/\mu L$), unlabeled poly-dIdC, thus excluding non-specific DNA binding as the origin of the anisotropy increase.

The binding curves for monomer and dimer in the presence of manganese were fit using the Hill equation, yielding values for the binding midpoint and Hill constant $K_{1/2} = 20 \pm 1$ nM and $n = 1.66 \pm 0.07$ for the dimer. For the Fur monomer these values were $K_{1/2} = 109 \pm 2$ nM and $n = 2.40 \pm 0.1$. It was surprising to us that the monomer was able to bind specifically to the DNA. We were therefore especially careful to exclude the presence of traces of dimeric Fur. Using exclusion chromatography with 1 mM $MnSO_4$, both after and before the titration, neither Fur dimer, nor reduced monomer able to dimerize under the experimental conditions could be detected.

Dimer to monomer transition

The dimer was treated with diamide (an oxidant of thiol) and hydrogen peroxide. The reaction was monitored by exclusion chromatography. When hydrogen peroxide or diamide was added, two new species appeared, eluted at 11.3 mL and 13 mL, corresponding to a monomeric species and probably to degraded protein (not shown). The figure 9 shows the proportions of dimer, monomer and degraded species as a function of time after H_2O_2 treatment. The decrease in dimer concentration was correlated to the appearance of the monomer and the degraded species. The rate of dimer disappearance was characterized by a half life $t_{1/2} = 2.5$ h. Similar results were obtained with

diamide, but exhibiting a slower rate ($t_{1/2} = 4.8$ h). The addition of 2 mM EDTA by itself did not lead to formation of monomer on this time scale (24 h), but it did accelerate the formation of the monomer when added together with diamide ($t_{1/2} = 3.5$ h).

Discussion

This paper describes the various oligomeric states of Fur, and the factors involved in their interconversion. It is not unlikely that *in vivo* Fur exists in oligomeric states other than the well characterized dimeric state. This may be of consequence for Fur function, notably in the cellular response to stress, particularly against oxidative and acid stress, as will be discussed below.

Gel exclusion chromatography and mass spectrometry analysis clearly show the presence of tetramer and higher molecular weight species (hexamer and/or octamer). We show that oligomerization is sensitive to pH and salt concentration suggesting that the intersubunit contacts are at least partially based on attractive electrostatic interactions. Decrease of the pH favors formation of higher-order oligomers. The equilibrium constant of dissociation of the tetramer decreases seven fold when the pH is decreased from pH = 7 to pH = 6.5. This is consistent with earlier electron microscopy studies indicating a pH-driven oligomerization: tetramer and octamer were present at pH 7.0-7.5 but not under alkaline conditions (pH = 8.5-9) (16). Our results indicate a significantly higher oligomerization constant (the higher-order species observed by Le Cam *et al.* (16) were obtained at concentrations as low as 180 μM Fur), but this may be related to the use of previously lyophilized protein samples in the mentioned study. It is likely that the groups involved are histidine sidechains which have a pK_a around 6.5. Fur is especially rich in histidine residues (12 histidines per monomer) and earlier NMR titrations had shown that 7 of the 12 histidines had a pK_a within 6.2 to 6.7 (33). In order to estimate whether or not oligomerization occurs *in vivo*, the total concentration of Fur inside the cell has been estimated using the following calculation. The abundance of Fur molecules has been estimated at about 5000 copies/cell in exponentially growing *E. coli* (34) and from 2500 to 7500 copies/cell in *Vibrio cholerae* cultures between their exponential to stationary growing phases

(35). Under oxidative stress conditions, an amount of 10000 copies / cell has been reported in *E. coli* (34). Considering a maximum variation in cell volume between 3.5×10^{-15} L and 1×10^{-15} L in LB medium (36), the total Fur concentration inside a single cell is in the range of 1 μ M to 17 μ M. This would indicate that higher-order Fur oligomers are most probably not present *in vivo*. Moreover, considering that K^+ , which is the principle monocation present in the cell, is thought to be present in concentrations between 0.1 and 0.5 M (37,38), the presence of higher-order Fur oligomers is even less likely. Nevertheless, *in vitro* Fur polymerization on its cognate DNA in presence of activating metal has been well established for the aerobactin promoter by electron microscopy and DNase protection experiments (15,16). Cooperative binding of additional Fur molecules adjacent to iron-box bound Fur was related to lateral protein-protein interaction (17). In addition, it was suggested that this side-by-side oligomerization is correlated to a gradual physiological response to Fe^{2+} (17). It is noteworthy that we have identified dimeric, tetrameric and hexameric species, which may suggest that oligomerization in solution occurs by successive association of dimeric units, possibly related to a side-by-side polymerization on DNA. Despite the fact that the Fur concentration *in vivo* is much less than the tetramerization equilibrium constant and despite the relatively high salt concentration in the cell, it cannot be excluded that the oligomerization phenomena described here do actually occur in the cellular environment. The intrinsic and non-specific affinity of DNA-binding proteins for DNA can significantly raise their local concentration immediately near the DNA, thus allowing the possibility of local Fur concentrations high enough to allow the formation of higher-order oligomers to form on the DNA (39). We have shown here that oligomerization of Fur is significantly more favored at low pH. In this respect it is interesting to note that Fur has been shown to be involved in the acid tolerance response in *E. coli*, *H. pylori* and *S. typhimurium* (10,11,40,41). In the latter organism, Fur regulates up to 35 genes in order to maintain a non-lethal intracellular pH (10). It is also interesting to note that for its role in acid response, Fur does not require an activating metal (11). It is thus not *a priori* excluded that the pH-regulated oligomerization described here plays a role in the mechanism by

which Fur executes its role in acid tolerance response.

In this paper, we also unambiguously demonstrate that the structural zinc of *E. coli* Fur is essential for upholding the dimeric structure. Purification of Fur from over-expressing cells yields significant amounts of a monomeric form, particularly when the extraction is done in presence of high concentration of metal chelators (EDTA). The as-isolated monomeric species is in an oxidized form containing two disulfide bridges between Cys92-Cys95 and Cys132-Cys137. It can be converted to Fur dimer by DTT-mediated disulfide bridge reduction and subsequent reconstitution with zinc as seen by gel filtration, crosslink experiments and CD spectroscopy. The dimer formed in this way is undistinguishable from the as-isolated dimer, exhibiting the same metal dependent DNA binding activity and the same secondary structure according to CD spectroscopy. The reduced monomer was unable to dimerize alone but required zinc (or an alternative divalent cation), demonstrating that coordination of the zinc ion is the crucial step in dimerization. We have also shown that Mn^{2+} can substitute Zn^{2+} to form a dimer from the reduced monomer but is less efficient. This is probably due to the intrinsic properties of these ions, as a tetrahedral site with two thiolate ligands is more likely to accommodate Zn^{2+} (42).

Although several divalent cations can trigger dimerization, zinc seems to be favored *in vivo*. Zinc, being chemically relatively inert, is generally the more appropriate transition metal for a structural role such as stabilization of quaternary structure (42).

From a structural point of view, the CD data clearly show that reduction by DTT did not change the secondary structure of monomeric Fur and that the monomeric form of Fur seems less structured than the dimer. Upon zinc-induced dimerization, a significant amount of additional secondary structure is generated. In addition, experiments using chemical crosslinkers have revealed interesting structural aspects of the non-activated, dimeric Fur protein. The analysis of the EDC crosslinked dimer demonstrates that the N-terminal NH_2 of one subunit is in ionic interaction with one or more acidic residues of the C-terminal tail of the other subunit in the non-activated dimeric form. Furthermore, additional contacts between the N-terminal amino group and Lys76 and Lys97 have

been detected using a DMA crosslinker. Binding of manganese to the iron site of the dimeric form seems to prevent these interactions. It is noteworthy that such interactions have not been seen in the structure of the metal activated form of *P. aeruginosa* Fur. Therefore, this difference may be related to the metal-dependent activation mechanism of Fur. A more detailed characterization of the structural variations occurring during activation and metal-induced dimerization is presented in the accompanying paper (43).

We also present evidence that the dimeric structure of Fur can be directly disrupted following treatment with oxidants such as H_2O_2 or diamide. It is possible that *in vivo*, under conditions of oxidative stress, conversion of Fur dimers to monomers takes place. This is likely to be caused by oxidation of the thiolates of Cys92 and Cys95, leading to loss of the zinc ion from the protein. The *in vitro* process is accelerated by the presence of EDTA indicating that oxidation of the cysteines themselves proceeds faster in absence of the zinc. This is further corroborated by observation that in the monomeric apo-protein, the cysteines involved in binding of the zinc ion, Cys92 and Cys95, are air-sensitive ($t_{1/2} = 1h$) whereas they are stable to air when zinc is bound and dimer is formed. We observed using fluorescence anisotropy that binding of the monomer to the consensus Fur box is metal dependent with an apparent affinity 5.5 times lower compared to the dimer. This may suggest a fine tuning of Fur activity as a function of the redox state of the protein.

Altogether, it can thus be envisaged that the reversible redox control of quaternary Fur structure allows a partial rather than a global derepression of the Fur regulon, under oxidative stress conditions. Indeed, several reports suggest that, *in vivo*, Fur itself may be directly sensitive to oxidants such as H_2O_2 . (44-49) A redox-mediated dimer to monomer transition leading to altered reactivity of Fur, could explain those results. Clearly, if this is the case, this opens yet another mechanism by which Fur executes its powerful role as global regulator. Another exciting possibility is that Fur dimers and monomers have different target regulatory DNA sites, but because we have only studied binding of dimeric and monomeric Fur to the consensus iron box sequence, we can at the moment only speculate that this is the case.

These results raise important questions regarding the interplay of iron metabolism and

response to oxidative stress. There are conflicting views in literature as whether iron uptake is activated or repressed during oxidative stress. The induction of the *fur* gene by OxyR in presence of hydrogen peroxide is thought to repress iron uptake more tightly in order to prevent formation of reactive oxygen species through the Fenton reaction (4,34). On the contrary, recent microarray analyses have challenged this model, as hydrogen peroxide actually activates the expression of several genes among the Fur regulon, but the physiological relevance remains unclear (9,44-46,48). Some authors suggested that this induction reflects the deleterious effect of oxidative agents on the Fur protein (47-49). Other authors have supported the idea of an adaptive mechanism (44-46). Recently, several global analyses of iron dependent gene regulation have indicated that the derepression of the Fur regulon, induced by iron starvation or deletion of the *fur* gene, redirects iron utilization toward essential enzymes and reduces the amount of iron accumulated in the bacteria (50-52). Similarly, derepression of the Fur regulon, observed as a result of hydrogen peroxide treatments, is potentially a protective mechanism which deviates iron utilization toward essential iron-dependent enzymes, required to cope with oxidative stress. Conversely, induction of *fur* expression by OxyR may serve in the first instants of the oxidative stress response to rapidly shut down iron uptake. In conclusion, a fine tuning of Fur repression mediated by a dimer to monomer transition could help to restrict iron utilization to critical enzymes and prevent accumulation of further iron during oxidative stress challenges.

The $C^{92}X_2C^{95}$ motif of *E. coli* Fur is highly conserved among Fur proteins from other microorganisms, suggesting that redox-controlled dimer/monomer transition may be a common feature of most Fur proteins. The Fur protein of *P. aeruginosa* is one of the few examples where this motif is not conserved, with a threonine in place of the *E. coli* cysteine Cys95. Interestingly, the CX_2C motif is also well conserved in Fur-like proteins such as PerR, FurA, CatR and FurS, described as oxidative stress sensors (53-56). A recent biochemical analysis of the Fur protein from *Anabaena* PCC 7119, which does contain this motif, suggests that formation of the dimer depends on the oxidation state of the cysteines (57). FurS from

Streptomyces reticuli is a zinc containing protein and the cysteines Cys96 and Cys99 (corresponding to the tandem Cys92, Cys95 of *E. coli* Fur) are redox sensitive (58). Formation of a disulfide bridge between Cys96 and Cys99 and subsequent release of the zinc ion by action of diamide and H₂O₂ is thought to be responsible for suppression of DNA binding activity of oxidized FurS (59). A similar mechanism has been described for *S. coelicolor* CatR but the role of the metal was not clearly defined (55). The as-isolated PerR from *Bacillus subtilis* contains one zinc ion per monomer and the DNA binding activity of the iron loaded PerR, PerR:Zn,Fe, is abolished by H₂O₂ treatment and restored by a thiol-reducing agent (60).

Interestingly, all these Fur-like oxidative stress sensors contain a second set of conserved cysteines, at the C-terminal end, with CX₂C motif which differs from the C¹³²X₄C¹³⁷ motif of *E. coli* Fur. This tandem, as observed for Cys92-Cys95, is redox active in *E. coli* Fur and may be involved in the dimer-monomer switch, because a Cys132-Cys137 disulfide bridge was identified in the monomer but not in the dimer. The role of these cysteines is currently under investigation.

More generally, H₂O₂ treatment is described to abolish the ability of FurA, FurS, CatR and PerR to bind DNA and in the case of

FurS, to release the zinc ion (53,55,59,61-64). Based on our results, we propose that peroxide sensing of Fur and Fur-like proteins involves disulfide bond formation between C92 and C95 (*E. coli* Fur numbering), that normally serve as ligands to the Zn²⁺ ion, and a concomitant loss of the quaternary structure with formation of monomeric oxidized species. This type of mechanism shares some similarities with the redox and zinc dependent structural switch mechanism of some zinc containing proteins (65). These proteins are activated by a thiol-disulfide switch leading to zinc release and subsequent modification of their architecture. For example, such a redox-zinc switch modifies the ability of Hsp33 to form a dimer and of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) anti-sigma factor RsrA to interact with a second protein, σ^R (66-71). We note, however, that *in vitro* formation of *E. coli* Fur monomer is slow ($t_{1/2}$ = 2.5 h) compared to the *in vivo* activation of gene expression by PerR in response to hydrogen peroxide challenges ($t_{1/2}$ < 1 minute) (72). This suggests that in the case of redox-sensing Fur-like proteins there may be a mechanism by which zinc release is accelerated to provide an efficient response to oxidative stress.

References

1. Hantke, K. (2001) *Curr Opin Microbiol* **4**, 172-177
2. Angerer, A., and Braun, V. (1998) *Arch Microbiol* **169**, 483-490
3. Escolar, L., Perez-Martin, J., and de Lorenzo, V. (1999) *J Bacteriol* **181**, 6223-6229
4. Touati, D. (2000) *Arch Biochem Biophys* **373**, 1-6
5. de Lorenzo, V., Wee, S., Herrero, M., and Neilands, J. B. (1987) *J Bacteriol* **169**, 2624-2630.
6. Calderwood, S. B., and Mekalanos, J. L. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 1015-1017
7. D'Autréaux, B., Touati, D., Bersch, B., Latour, J. M., and Michaud-Soret, I. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16619-16624
8. D'Autréaux, B., Horner, O., Oddou, J. L., Jeandey, C., Gambarelli, S., Berthomieu, C., Latour, J. M., and Michaud-Soret, I. (2004) *J Am Chem Soc* **126**, 6005-6016
9. Mukhopadhyay, P., Zheng, M., Bedzyk, L. A., LaRossa, R. A., and Storz, G. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 745-750
10. Foster, J. W., and Hall, H. K. (1992) *J Bacteriol* **174**, 4317-4323.
11. Hall, H. K., and Foster, J. W. (1996) *J Bacteriol* **178**, 5683-5691.
12. Neilands, J. B., and Nakamura, K. (1991) in *CRC Handbook of Microbial Iron Chelates* (Winkelmann, G., ed), pp. 1-14
13. Michaud-Soret, I., Adrait, A., Jaquinod, M., Forest, E., Touati, D., and Latour, J. M. (1997) *Febs Letters* **413**, 473-476
14. Braun, V., Schäffer, S., Hantke, K., and Tröger, W. (1990) in *The Molecular Basis of Bacterial Metabolism. Colloquium Mosbach 1990*, pp. 165-179, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
15. Frechon, D., and Le Cam, E. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Com.* **201**, 346-355

16. Le Cam, E., Frechon, D., Barray, M., Fourcade, A., and Delain, E. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11816-11820
17. Escolar, L., Perez-Martin, J., and de Lorenzo, V. (2000) *J Biol Chem* **275**, 24709-24714.
18. Pohl, E., Haller, J. C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E., and Vasil, M. L. (2003) *Mol Microbiol* **47**, 903-915
19. Jacquamet, L., Aberdam, D., Adrait, A., Hazemann, J. L., Latour, J. M., and Michaud-Soret, I. (1998) *Biochemistry* **37**, 2564-2571
20. Adrait, A., Jacquamet, L., Le Pape, L., Gonzalez de Peredo, A., Aberdam, D., Hazemann, J. L., Latour, J. M., and Michaud-Soret, I. (1999) *Biochemistry* **38**, 6248-6260
21. Jacquamet, L., Dole, F., Jeandey, C., Oddou, J. L., Perret, E., Le Pape, L., Aberdam, D., Hazemann, J. L., Michaud-Soret, I., and Latour, J. M. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 394-395
22. Gonzalez de Peredo, A., Saint-Pierre, C., Adrait, A., Jacquamet, L., Latour, J. M., Forest, E., and Michaud-Soret, I. (1999) *Biochemistry* **38**, 8582-8589
23. Wee, S., Neilands, J. B., Bittner, M. L., Hemming, B. C., Haymore, B. L., and Seetharam, R. (1988) *Biol. Metals* **1**, 62-68
24. Manning, L. R., Jenkins, W. T., Hess, J. R., Vandegriff, K., Winslow, R. M., and Manning, J. M. (1996) *Protein Sci* **5**, 775-781.
25. Andreeva, A. L., Andreev, O. A., and Borejdo, J. (1993) *Biochemistry* **32**, 13956-13960
26. Dallmann, H. G., Flynn, T. G., and Dunn, S. D. (1992) *J Biol Chem* **267**, 18953-18960
27. Lacroix, M., Rossi, V., Gaboriaud, C., Chevallier, S., Jaquinod, M., Thielens, N. M., Gagnon, J., and Arlaud, G. J. (1997) *Biochemistry* **36**, 6270-6282
28. Mills, S. A., and Marletta, M. A. (2005) *Biochemistry* **44**, 13553-13559
29. Smith, A., Hooper, N. I., Shipulina, N., and Morgan, W. T. (1996) *J Protein Chem* **15**, 575-583
30. Hamed, M. Y., and Neilands, J. B. (1994) *J Inorg Biochem* **53**, 235-248
31. Li, R., Nagai, Y., and Nagai, M. (2000) *J Inorg Biochem* **82**, 93-101
32. Sreerama, N., and Woody, R. W. (2004) *Methods Enzymol* **383**, 318-351
33. Saito, T., Duly, D., and Williams, R. P. J. (1991) *Eur. J. Biochem.* **197**, 39-42
34. Zheng, M., Doan, B., Schneider, T. D., and Storz, G. (1999) *J Bacteriol* **181**, 4639-4643.
35. Watnick, P. I., Eto, T., Takahashi, H., and Calderwood, S. B. (1997) *J Bacteriol* **179**, 243-247.
36. Ali Azam, T., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S., and Ishihama, A. (1999) *J Bacteriol* **181**, 6361-6370.
37. Bremer, H., Dennis, P. P., and Neidhardt, F. C. (1996) in *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* Vol. 2, pp. 1553-1569, 2 vols., Washington, DC
38. Outten, C. E., and O'Halloran, T. V. (2001) *Science* **292**, 2488-2492.
39. Jen-Jacobsen, L. (1997) *Biopolymers* **44**, 153-180
40. Audia, J. P., Webb, C. C., and Foster, J. W. (2001) *Int J Med Microbiol* **291**, 97-106
41. Bijlsma, J. J., Waidner, B., Vliet, A. H., Hughes, N. J., Hag, S., Bereswill, S., Kelly, D. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Kist, M., and Kusters, J. G. (2002) *Infect Immun* **70**, 606-611
42. Berg, J. M., and Shi, Y. (1996) *Science* **271**, 1081-1085
43. Pecqueur, L., D'Autréaux, B., Dupuy, J., Nicolet, Y., Jacquamet, L., Brutscher, B., Michaud-Soret, I., and Bersch, B. (2006) *J. Biol. Chem.*, next paper in this issue
44. Lee, J. H., Yeo, W. S., and Roe, J. H. (2004) *Mol Microbiol* **51**, 1745-1755
45. Mostertz, J., Scharf, C., Hecker, M., and Homuth, G. (2004) *Microbiology* **150**, 497-512
46. Zeller, T., Moskvina, O. V., Li, K., Klug, G., and Gomelsky, M. (2005) *J Bacteriol* **187**, 7232-7242
47. Zheng, M., Wang, X., Doan, B., Lewis, K. A., Schneider, T. D., and Storz, G. (2001) *J Bacteriol* **183**, 4571-4579
48. Grifantini, R., Frigimelica, E., Delany, I., Bartolini, E., Giovinazzi, S., Balloni, S., Agarwal, S., Galli, G., Genco, C., and Grandi, G. (2004) *Mol Microbiol* **54**, 962-979
49. Pomposiello, P. J., Bennik, M. H., and Demple, B. (2001) *J Bacteriol* **183**, 3890-3902
50. Abdul-Tehrani, H., Hudson, A. J., Chang, Y. S., Timms, A. R., Hawkins, C., Williams, J. M., Harrison, P. M., Guest, J. R., and Andrews, S. C. (1999) *J Bacteriol* **181**, 1415-1428
51. McHugh, J. P., Rodriguez-Quinones, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D. A., Poole, R. K., Cooper, C. E., and Andrews, S. C. (2003) *J Biol Chem* **278**, 29478-29486
52. Masse, E., Vanderpool, C. K., and Gottesman, S. (2005) *J Bacteriol* **187**, 6962-6971
53. van Vliet, A. H., Baillon, M. L., Penn, C. W., and Ketley, J. M. (1999) *J Bacteriol* **181**, 6371-6376
54. Pagan-Ramos, E., Song, J., McFalone, M., Mudd, M. H., and Deretic, V. (1998) *J Bacteriol* **180**, 4856-4864
55. Hahn, J. S., Oh, S. Y., Chater, K. F., Cho, Y. H., and Roe, J. H. (2000) *J Biol Chem* **275**, 38254-38260
56. Zou, P., Borovok, I., Ortiz de Orue Lucana, D., Muller, D., and Schrempf, H. (1999) *Microbiology* **145** (Pt 3), 549-559

57. Hernandez, J. A., Bes, M. T., Fillat, M. F., Neira, J. L., and Peleato, M. L. (2002) *Biochem J* **366**, 315-322
58. Ortiz de Orue Lucana, D., Troller, M., and Schrempf, H. (2003) *Mol Genet Genomics* **268**, 618-627
59. Ortiz de Orue Lucana, D., and Schrempf, H. (2000) *Mol Gen Genet* **264**, 341-353
60. Herbig, A. F., and Helmann, J. D. (2001) *Mol Microbiol* **41**, 849-859
61. Bsai, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P., and Helmann, J. D. (1998) *Mol Microbiol* **29**, 189-198
62. Horsburgh, M. J., Clements, M. O., Crossley, H., Ingham, E., and Foster, S. J. (2001) *Infect Immun* **69**, 3744-3754
63. Brenot, A., King, K. Y., and Caparon, M. G. (2005) *Mol Microbiol* **55**, 221-234
64. Zahrt, T. C., Song, J., Siple, J., and Deretic, V. (2001) *Mol Microbiol* **39**, 1174-1185
65. Maret, W. (2005) *J Trace Elem Med Biol* **19**, 7-12
66. Jakob, U., Eser, M., and Bardwell, J. C. (2000) *J Biol Chem* **275**, 38302-38310
67. Barbirz, S., Jakob, U., and Glocker, M. O. (2000) *J Biol Chem* **275**, 18759-18766
68. Graumann, J., Lilie, H., Tang, X., Tucker, K. A., Hoffmann, J. H., Vijayalakshmi, J., Saper, M., Bardwell, J. C., and Jakob, U. (2001) *Structure (Camb)* **9**, 377-387
69. Hoffmann, J. H., Linke, K., Graf, P. C., Lilie, H., and Jakob, U. (2004) *Embo J* **23**, 160-168
70. Kang, J. G., Paget, M. S., Seok, Y. J., Hahn, M. Y., Bae, J. B., Hahn, J. S., Kleanthous, C., Buttner, M. J., and Roe, J. H. (1999) *Embo J* **18**, 4292-4298
71. Paget, M. S., Bae, J. B., Hahn, M. Y., Li, W., Kleanthous, C., Roe, J. H., and Buttner, M. J. (2001) *Mol Microbiol* **39**, 1036-1047
72. Helmann, J. D., Wu, M. F., Gaballa, A., Kobel, P. A., Morshedi, M. M., Fawcett, P., and Paddon, C. (2003) *J Bacteriol* **185**, 243-253

Footnotes

We are indebted to Julien Viret and Colette Lebrun for their help in the experimental work. Supplementary material containing two tables and one figure related to the mass analyses of the crosslinked experiments is available.

Abbreviations

The abbreviations used are: Fur: Ferric Uptake Regulation protein; EDTA: Ethylene Diamino Tetraacetic Acid; PMSF: Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride; Mes: 2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid, MOPS: Morpholinopropanesulfonic acid; BTP: Bis-Tris Propane: (1,3-bis[tris(Hydroxymethyl) methylamino]-propane); Tris: Tris (hydroxymethyl) amino methane; ESI-MS: Electrospray Ionization-Mass Spectrometry; Fur-Met, Fur protein without the N-terminal methionine; MALDI-TOF, matrix-assisted-laser desorption/ionization-time of flight; HPLC, high pressure liquid chromatography; LC, liquid chromatography; EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide;

Figure Legends

Figure 1. Influence of protein concentration, KCl and pH on the oligomerization equilibrium, followed by exclusion chromatography.

Chromatograms of Fur at various protein concentrations (**A**), KCl concentrations (**B**) and various protein concentrations at pH = 6.5 (**C**) and pH = 7.0 (**D**). The protein concentrations, expressed in subunit concentration were (**A**) 1.5 mM, 1.0 mM, 0.5 mM and 0.2 mM in buffer MOPS 0.1 M, KCl 0.1 M, pH = 7.5, the solutions were allowed to equilibrate 6 h at 25°C, (**B**) 1.5 mM in buffer MOPS 0.1 M, pH = 7.5 containing KCl at 0.1 M, 0.5 M and 1 M, the solutions were allowed to equilibrate 6 h at 25°C and (**C**, **D**) 240 µM, 180 µM, 120 µM, 60 µM, 20 µM in BTP 0.1 M, KCl 0.1 M pH = 6.5 (**C**) and pH = 7.0 (**D**), the solutions were allowed to equilibrate 10 h at 4°C. All these solutions were loaded on a Superdex 75 HR 10/30 column (Amersham Biosciences) equilibrated with the corresponding buffer. Final protein and KCl concentrations are indicated. All the chromatograms were

normalized to the peak of the dimer. (E) Plot according to Manning *et al.*(24) of $\text{Log}(C_0)$ vs $\text{Log}[(\%T)/(0.01*(100-\%T-\%O)^2)]$. Here C_0 represents total protein concentration and %T and %O, the percentages of tetramer and hexamer/octamer, respectively (protein concentrations are expressed in monomeric subunit concentration). A linear fit through the data points with slope = 1.0 gives the equilibrium constants at $y = 0$. In our case, the equilibrium constants obtained were 0.72 ± 0.02 mM and 5.0 ± 0.1 mM at pH 6.5 and 7, respectively, in BTP 0.1M, KCl 0.1M, at 4°C.

Figure 2. Identification of oligomers by mass spectrometry under non-denaturing conditions.

(A) Mass spectrum of Fur under non-denaturing conditions indicating the presence of oligomeric states. Peaks corresponding to the dimeric, tetrameric and hexameric forms have been labeled with D, T and H, respectively, with the associated state of charge. The protein sample (100 μ M in ammonium acetate buffer at pH = 6.6) was injected using nanospray in an electrospray-TOF mass spectrometer. (B) Expansion of the m/z range from 2700 to 3600. M symbolizes a monomer unit, the star the N-terminal methionine-excised form and Zn the zinc ion content.

Figure 3. Influence of DTT and zinc on monomeric Fur, followed by exclusion chromatography.

Exclusion chromatography profile of the monomeric species at 1.9 mM in Tris/HCl buffer at 0.1 M, pH = 8 containing 0.1 M KCl in presence of DTT and/or Zn^{2+} at 25°C. (A) 10 min after addition of four equivalents of DTT/monomer, one equivalent of Zn^{2+} /monomer was added; (B) 1 h after addition of four equivalents of DTT/monomer, one equivalent of Zn^{2+} /monomer was added; (C) after addition of one equivalent Zn^{2+} /monomer; (D) after addition of four equivalents of DTT/monomer.

Figure 4. Influence of DTT, Zn^{2+} and Mn^{2+} on monomeric Fur, followed by EDC crosslink.

SDS-PAGE analysis of EDC crosslink experiment of Fur monomer (A) and dimer (B): The Fur monomer and dimer samples (40 μ M in 20 mM MOPS buffer at pH = 7 containing 0.15 M KCl) were incubated in presence of: 10 equivalents/subunit DTT, 100 equivalents/subunit EDTA and various equivalents/subunit of metal ion sulfate (1, 10 and 100) as indicated in the Figure. The EDC treatments were performed as described in the materials and methods part. The molecular weight markers are in lane 1.

Figure 5. MALDI-TOF mass spectra of digested crosslinked dimer.

MALDI-TOF mass spectra of peptide mixtures obtained by endoproteinase Lys-C digestion of (1) non-linked monomers and (2) covalent crosslinked dimer, isolated after treatment of the protein with EDC.

Figure 6. Identification of amino acids -linked with EDC.

MALDI-TOF mass spectra were obtained for (1) crosslinked peptides (MT1-K8) + (H117-K147) and (2) resulting peptides after CNBr cleavage.

Figure 7. Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism spectra of *E. coli* Fur at 20 μ M in the Far U.V.: (A) Fur dimer (D) compared to the oxidized monomer (M_{ox}), the reduced monomer (M_{red}) obtained after addition of 20 equivalents of DTT/monomer and the reduced monomer plus one zinc sulfate equivalent/monomer (M_{red} , Zn), respectively; **Insert:** Zinc titration of the reduced monomer after addition of 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 equivalents respectively of Zn^{2+} /monomer. (B) Difference spectra of $[(M_{ox})-(M_{red})]$, $[(M_{red}, \text{Zn})-(M_{red})]$ and $[(D)-(M_{ox})]$. The buffer contribution (20 mM MOPS, 40 mM KCl at pH = 7) was always subtracted from the spectra which were all normalized with respect to the protein concentration.

Figure 8. DNA binding activity followed by fluorescence anisotropy.

Dimer and monomer binding to a fluorescein labelled 25bp oligonucleotide containing the consensus Fur box in the absence (\square) and presence (\circ) of 1 mM MnSO_4 in the buffer. The anisotropy is plotted as a function of total protein concentration. The solid lines through the data represent fits with Graph

Pad Prism software using the Hill equation (see text). Conditions: 10 nM DNA in 20 mM MOPS buffer at pH = 7, containing 150 mM KCl, 10 µg/mL poly-dIdC and 12 mM MgSO₄ at 25°C.

Figure 9. Influence of H₂O₂ on the dimeric form.

Evolution in time of the percentage of the dimer, monomer and proteolyzed forms after treatment of 20 µM Fur dimer with 2mM H₂O₂. The concentration of each species was determined using gel exclusion chromatography by measuring the area under the peak of each species. Assuming the H₂O₂ concentration to be constant, the data were analyzed using a single exponential decrease in dimer concentration with a pseudo first order rate constant $k = 0.28 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 2.5 \text{ h}$) with the Graph Pad Prism software.

Supplementary material

Table 1S: Cysteine alkylation pattern of Fur dimer and monomer.

The dimer (50 µM) and the monomer (50 µM) in Tris/HCl 0.1 M (pH = 8), 0.1 M KCl, 50 mM EDTA, without and with DTT (200 µM), were treated with iodoacetamide (6 mM) during 24h and analyzed by electrospray mass spectrometry. In the designation Fur*+n, the star is for the N-terminal methionine excised form of Fur and n for the number of alkyl group covalently linked.

Table 2S: Peptide map of endoproteinase Lys-C digested monomer.

The monomer (25 µM) in 100 mM ammonium bicarbonate (pH = 7.9), without and with DTT (200 µM), was digested with endoproteinase Lys-C and the crude peptides were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry.

Figure S1. MALDI-TOF mass spectra of peptides obtained by endoproteinase Glu-C digestion of 1) non-linked monomers and 2) covalent crosslinked dimer, isolated after treatment of the protein with DMA. After cleavage of each of the species, resulting peptides were separated by HPLC and each fraction was analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. The figure shows in each case the spectrum of the HPLC fraction in which peptide (Thr1-Glu23) was eluted.

Supplementary material

This calculation has been applied to the equilibrium between dimer and tetramer, whatever the nature of the other oligomeric form, which does not interfere in the calculation. Here we have considered an octamer.

The expression of the equilibrium constant for the dissociation of the tetramer, K_{tet} , as a function of the concentrations at equilibrium is:

$$K_{tet} = [D']^2 / ([T'] * C) \text{ where } C = 1 \text{ mol.L}^{-1} \quad (1)$$

[D'] and [T'] represent the concentration of dimer and tetramer respectively.

$$C_0 = [D] + [T] + [O] \quad (2)$$

[D], [T], [O] and C_0 represent the concentration of dimer, tetramer and octamer and the total protein concentration, respectively, all expressed in monomer unit, and linked to the concentrations of dimer and tetramer by:

$$[D'] = [D] / 2 \quad (3)$$

$$[T'] = [T] / 4 \quad (4)$$

Using equations (3) and (4), the expression of K_{tet} is now:

$$K_{tet} = ([D]/2)^2 / ([T]/4) \quad (5)$$

further simplified to:

$$K_{tet} = [D]^2 / [T] \quad (6)$$

The percentage of protein in each oligomeric form is:

$$\%T = [T] * 100 / C_0 \quad (7)$$

$$\%O = [O] * 100 / C_0 \quad (8)$$

K_{tet} is expressed as a function of C_0 , [T] and [O], by replacing [D] in (6) using equation (2):

$$K_{tet} = (C_0 - [T] - [O])^2 / [T] \quad (9)$$

Using the equations (7) and (8), [T] and [O] are replaced in equation (9) by expressing them as a function of C_0 , %T and %O:

$$K_{tet} = 0.01 * C_0 * (100 - \%T - \%O)^2 / \%T \quad (10)$$

By applying the Log function to equation (10) we obtain equation (11):

$$\text{Log} (\ \%T / (0.01 * (100 - \%T - \%O)^2)) = \text{Log } C_0 - \text{Log } K_{tet} \quad (11)$$

Finally plotting of $\text{Log} (\ \%T / (0.01 * (100 - \%T - \%O)^2))$ as a function of $\text{Log } C_0$ yields a straight line with a slope equal to 1, intersecting the x-axis at $\text{Log } C_0 = \text{Log } K_{tet}$.

The values of % T and % O were determined by measuring the areas under each peak:

$$\%T = A2 * 100 / (A1 + A2 + A3) \text{ and}$$

$$\%O = A3 * 100 / (A1 + A2 + A3)$$

A1, A2 and A3 represent the areas under the peak of the dimer, tetramer and octamer, respectively.

Figure 1

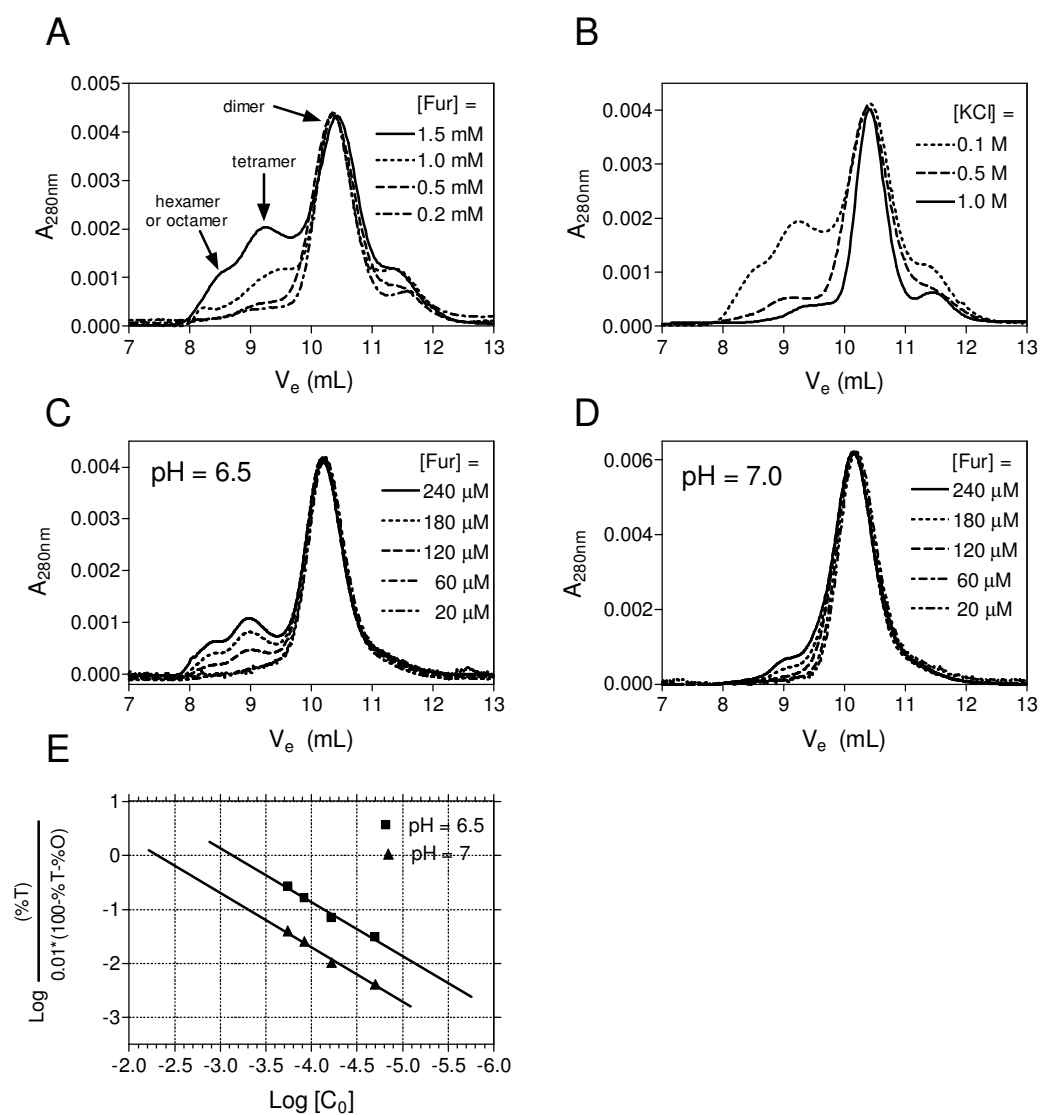


Figure 2

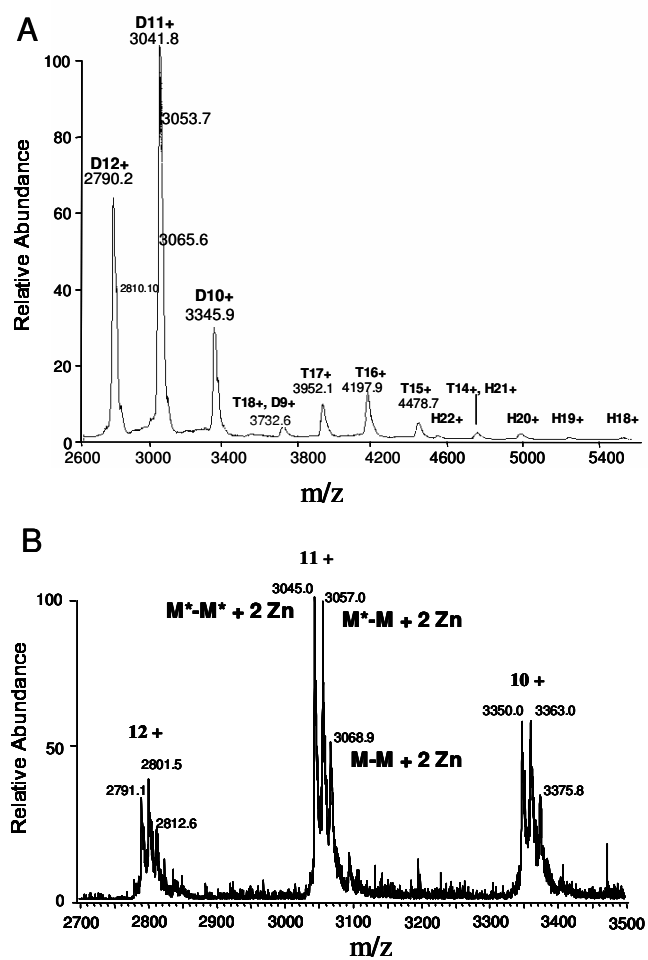


Figure 3

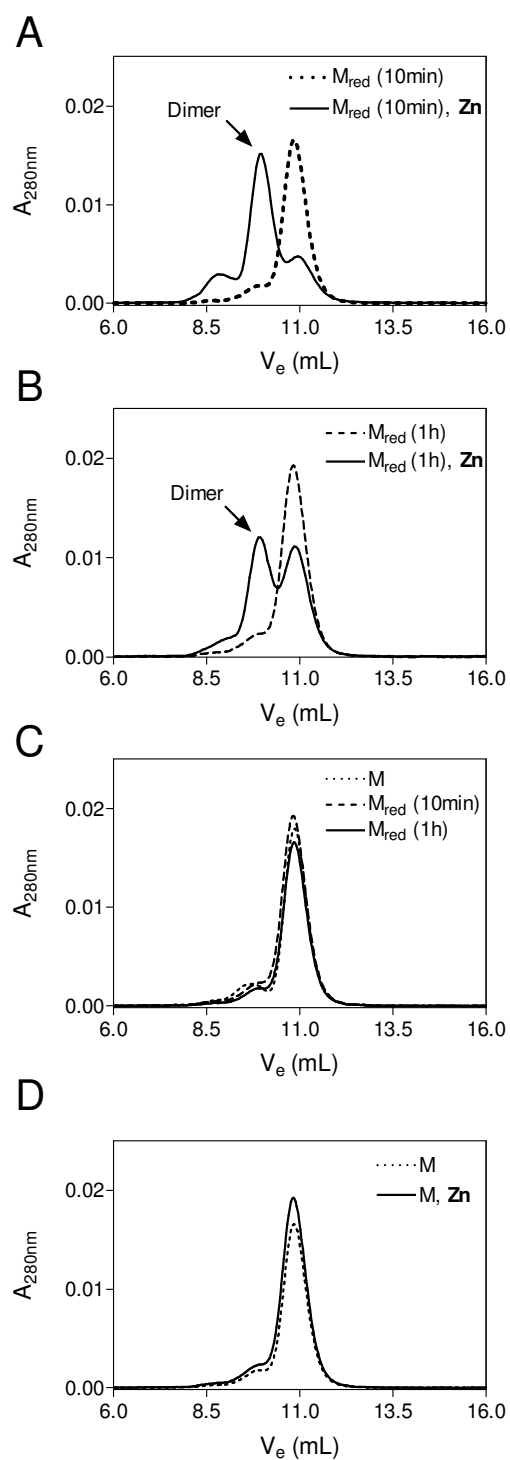


Figure 4

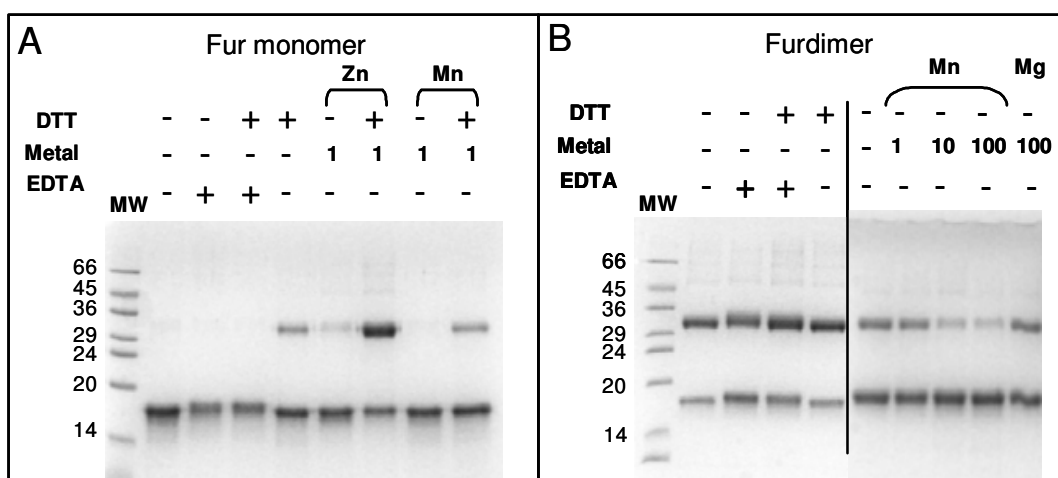


Figure 5

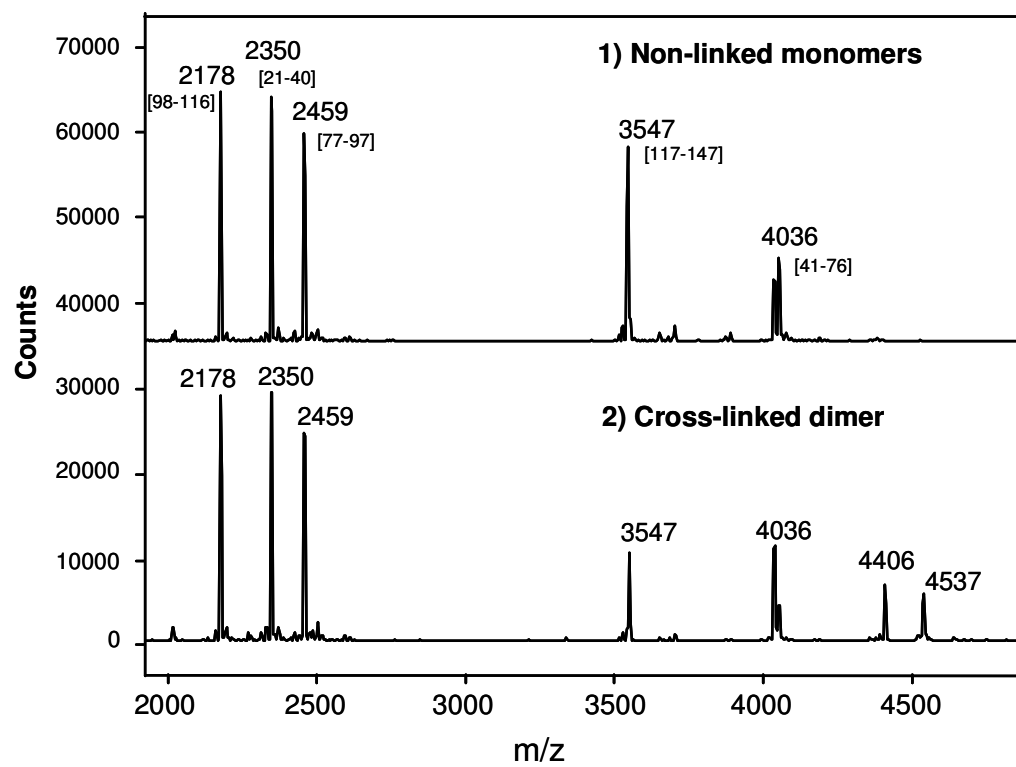


Figure 6

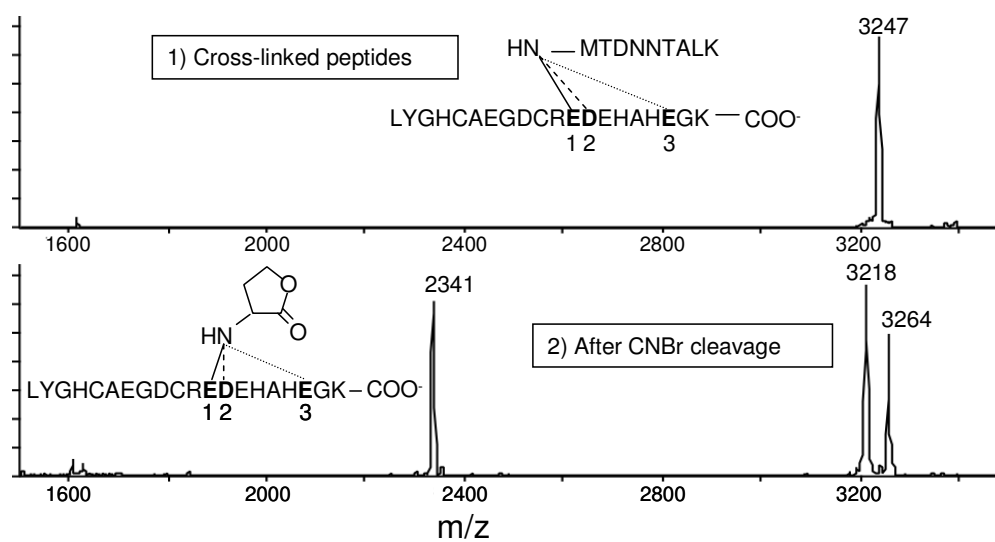


Figure 7

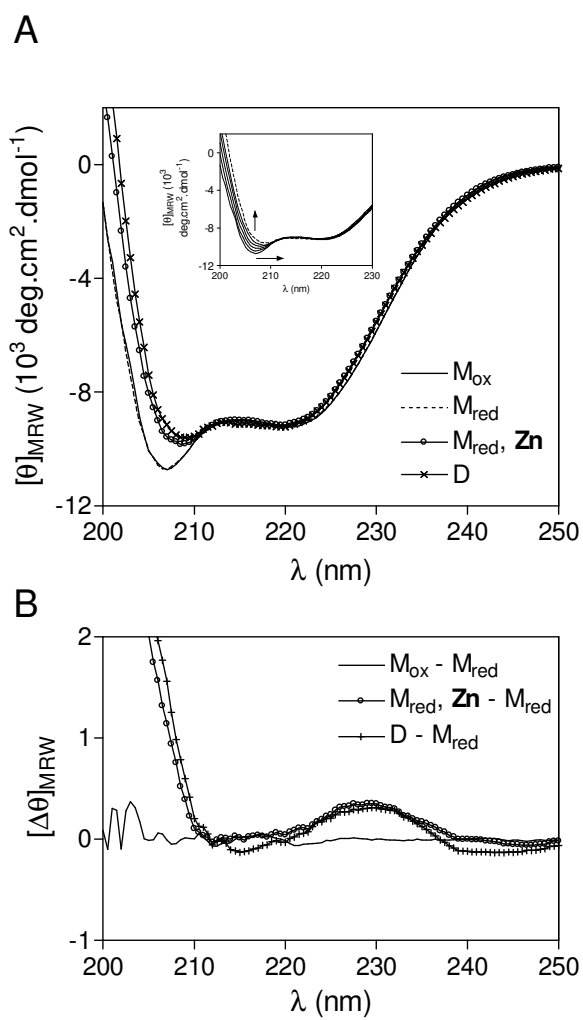


Figure 8

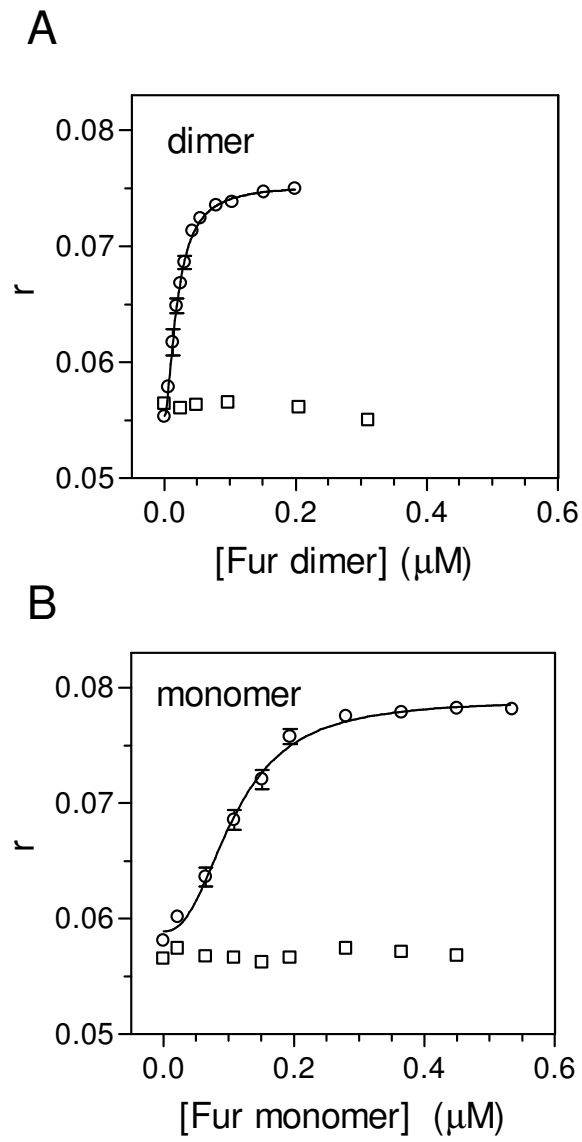
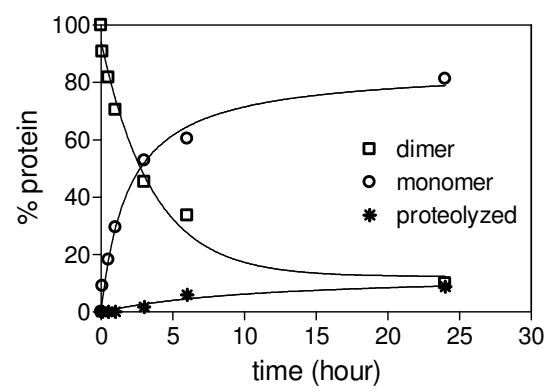


Figure 9



Supplementary material

Table S1

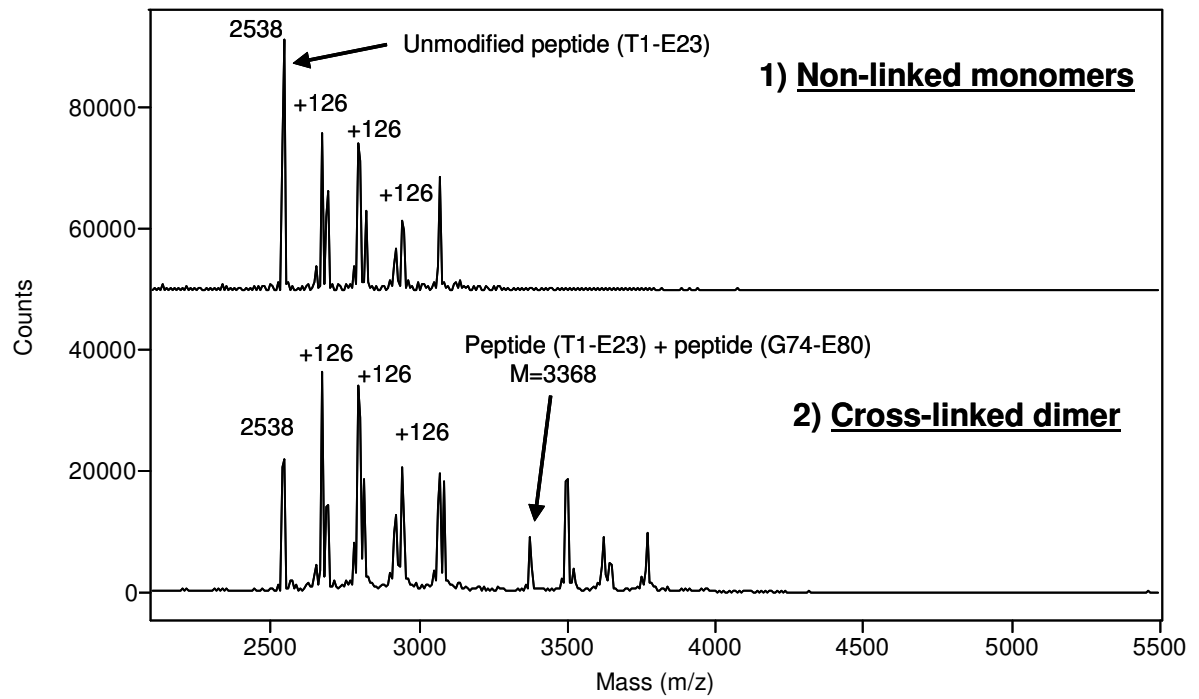
	Dimer		Monomer	
	Mass (\pm 3 Da)	Designation	Mass (\pm 3 Da)	Designation
+ EDTA	16891 17022	Fur*+4 Fur+4	16660 16791	Fur* Fur
+ EDTA + DTT	16891 17022	Fur*+4 Fur+4	16891 17022	Fur*+4 Fur+4

Table S2

number	Fragments	Expected	Measured - DTT	Measured + DTT
1	99 – 117	2177.1	2177.1	2177.1
2	22 – 41	2349.2	2349.3	2349.2
3	78 – 98	2460.2	2458.3	2460.2
4	118 – 148	3547.6	3545.7	3547.7
5	42 - 77	4034.1	4034.0	4034.1

Supplementary material

Figure S1



Structural changes of *E. coli* Fur during metal dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography

Ludovic Pecqueur^{⊥,§}, Benoît D'Autréaux[⊥], Jérôme Dupuy[#], Yvain Nicolet[#], Lilian Jacquamet[#], Bernhard Brutscher[§], Isabelle Michaud-Soret^{⊥*}, Beate Bersch^{§*}

[§] Laboratoire de RMN des Protéines and [#] Laboratoire de Cristallographie et de Cristallogénèse des Protéines, Institut de Biologie Structurale, Jean Pierre Ebel (UMR 5075 CNRS/CEA/UJF), F-38027 Grenoble Cedex 1, France

[⊥] Laboratoire de Physicochimie des Métaux en Biologie (UMR 5155 CNRS/CEA/UJF), Département Réponse et Dynamique Cellulaires, CEA-Grenoble, 17 avenue des Martyrs, F-38054 Grenoble cedex 9, France

Running Title: NMR and X-ray structural studies of *E. coli* Fur

Keywords: Ferric uptake regulator, NMR, X-ray crystallography, thiolate oxydation, dimer formation, helix-turn-helix

Addresses correspondence to:

Beate Bersch, de Résonance Magnétique Nucléaire, Institut de Biologie Structurale, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France, Tel. (33) 4 38 78 48 25 ; Fax. (33) 4 38 78 54 94 ; E-mail: beate.bersch@ibs.fr

and

Isabelle Michaud-Soret, Laboratoire de Physicochimie des Métaux en Biologie, Département de Réponses of dynamique et cellulaire, CEA-Grenoble, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France , Tel. (33) 4 38 78 99 40; Fax. (33) 4 38 78 34 62; E-mail: imichaud@cea.fr

Fur is a bacterial regulator that uses iron as a cofactor to bind to specific DNA sequences. Fur is usually isolated as a homodimer with two metal sites by subunit. Metal-binding to the iron site induces protein activation whereas the structural zinc site is related to a redox-controlled dimerization process (previous paper (1)). Structural studies of three different forms of the Escherichia coli Fur protein (non activated dimer, monomer and truncated Fur1-82) were performed. Dimerization of the oxidized monomer was followed by NMR in presence of a reductant (DTT) and Zn(II). Reduction of the disulfide bridges causes only local structure variations whereas zinc addition to reduced Fur induces a major conformational change of the dimerization domain, leading to an NMR spectrum identical to the one of the native

dimer. The secondary structure of the two forms is almost conserved in the N-terminal DNA-binding domain of the proteins, except for the first helix, which is not present in the non activated dimer. In contrast, the C-terminal dimerization domain is well structured in the dimer but appears flexible in the monomer. This is also confirmed by heteronuclear NOE data measured on both forms of the protein. The crystal structure at 1.8Å resolution of a truncated protein (Fur1-82), containing only the N-terminal domain, is described and found to be identical to the N-terminal domain in the monomeric and in the metal-activated state. Altogether, these data allow us to propose an activation mechanism for the Fur protein involving the folding/unfolding of the N-terminal helix.

Introduction

Iron is an essential element for almost all living organisms. However, the Fe(III) form is highly insoluble whereas in the Fe(II) form, iron is extremely limited and an excess of Fe(II) is toxic for the cell because of the formation of highly reactive radicals via the Fenton reaction. This is why the intracellular iron concentration has to be tightly regulated. In Gram negative bacteria, the Fur (ferric uptake regulator) protein plays the key role in regulating iron homeostasis. Fur is a global transcriptional regulator which controls the expression of more than 90 genes mainly implicated in iron uptake but also in other fundamental processes like the regulation of oxidative stress, acid tolerance and bacterial virulence determinants (2).

Fur is mainly described as a dimeric protein containing two metal-binding sites. Binding of a divalent cation (ferrous iron *in vivo*) to the regulatory site enables the protein to bind to a specific DNA sequence in the promoter region of iron-regulated genes, the Fur box (3), thus repressing gene transcription. In the regulatory site, the ferrous iron can be replaced by other divalent metal ions, such as Mn(II), Co(II), Zn(II), and Ni(II) (3-5). Previous results indicated that this site forms an axially distorted octahedral environment (6). At the end of the 1990s, two different groups identified a second metal site in the Fur protein, which binds Zn(II) with a very high affinity. This tetrahedral site involves two cysteines, Cys92 and Cys95 and two nitrogen/oxygen atoms in *Escherichia coli* Fur. This zinc site has been proposed to have a structural role (7).

In 2003, the first crystal structure of the Fur protein from *Pseudomonas aeruginosa* has been determined (8). The protein has been crystallized in presence of Zn(II) ions. Four metal ions were observed per monomer, two of them were bound to conserved ligands and therefore proposed to occupy the two characterized relevant sites. From the metal-site geometry in presence of zinc and after its substitution by iron in the regulatory site, the regulatory and the structural site could be identified (8). However, in *P. aeruginosa* Fur, the zinc-binding site is different from the one in *E. coli* Fur, as zinc is bound by two glutamic acids

and two histidines, which are also well conserved throughout the Fur family.

As expected, the structure showed the presence of an N-terminal winged helix-turn-helix motif, with an additional α -helix at the N-terminal end. It has been suggested that this helix might be involved in DNA-recognition (8). The C-terminal domain of one monomer is composed of a three-stranded β -sheet and an α -helix and is responsible for protein dimerization.

As described in the previous paper of this issue (1), Fur exists in solution under several oligomeric states. The Fur monomer, whose formation is not in simple equilibrium with the dimer, contains the four cysteines oxidized in two disulfide bridges Cys92-Cys95 and Cys132-Cys137. After reduction using dithiothreitol, the monomer contains four free cysteines but is still monomeric. However, dimerization of the monomer is observed by gel filtration chromatography in presence of a reductant (DTT) and Zn(II). The oxidized monomer is still active and able to bind to the consensus Fur box in a metal-dependent way but with a 5-times reduced activity. Monomeric Fur can be obtained from the dimer after H₂O₂ treatment, an observation which might be of biological relevance as the Fur protein is also involved in the control of oxidative stress.

Here we present the solution study of the Fur protein from *Escherichia coli* using NMR spectroscopy in order to get more insight into the structural modifications occurring during the dimerization process. NMR resonances of the dimeric but non-activated form of the protein (named Zn₅FurD for dimeric Fur protein containing zinc in the structural metal site) were assigned and the secondary structure of Zn₅FurD determined. Surprisingly, we detected differences with respect to the structure of the metal-activated protein from *P. aeruginosa* (8). In addition, we also studied the monomeric *E. coli* Fur protein and its conversion to the dimeric form upon zinc binding. Finally, a truncated protein comprising the first 82 amino acids, corresponding to the DNA binding domain, has been characterized by NMR and X-ray crystallography. Comparison of the different Fur forms yields valuable information on the structural reorganization of the Fur protein during dimerization and activation.

Materials and methods

Protein sample preparation

Protein purification was performed at 4°C and centrifugation at 6°C.

Native *E. coli* Fur was purified to homogeneity according to the published procedure (9). A higher yield in monomeric Fur can be obtained by increasing the EDTA concentration in the extraction buffer to 100 mM. The different oligomeric states of Fur were separated by gel filtration (Superdex 75 16/60 HR, Amersham Biosciences) in 0.1 M Tris/HCl 0.1 M KCl pH = 8 (4°C). 10% v/v glycerol was added before protein concentration and storage. Dimer / monomer fractions were pooled separately and concentrated to a final volume of 1 mL using an ultrafiltration support (Ultrafree 5K, Millipore). Protein concentrations, consistently expressed in subunit concentration unless indicated otherwise, were determined spectrophotometrically using an absorption coefficient of $0.4 \text{ mg}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 275 nm for one monomer of native Fur (10). The Fur1-82 mutant was generated by using the QuikChange site-directed mutagenesis kit from Stratagene with the two synthetic oligonucleotides primers 5' CCGTATTTGAACTGACATAGCAA CATCACCACGATC 3' and 5' GATCGTGGTGATGTTGCTATGTCAAGTTCA AATACGG 3' and the methylated plasmid pET30c-FUR containing the wild-type protein (9). The constructs were confirmed by DNA sequencing (Genome Express, Grenoble). Freshly transformed BL21(DE3) competent cells were plated on LB (0.1% agar) containing 50 µg/ml kanamycin and grown at 37°C. Cells were grown at 37°C from an overnight culture in 1 L of LB containing 50 µg/ml kanamycin. Fur1-82 expression was induced at $\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0.7\text{--}0.8$ by isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG) at a final concentration of 0.5 mM during 3 h. Cells were harvested at 5000 g for 5 min and the pellet was suspended in 30 mL of 0.1 M MOPS pH = 8, 0.1 M EDTA, 10% w/v sucrose, 10% glycerol v/v containing ICT 10 mg/mL, PMSF 10 µg/mL and pepstatineA 4 µg/mL (all from Sigma). Cells were disrupted by sonication and the supernatant obtained from centrifugation at 20000 g during 20 minutes was treated with 1% w/v streptomycin sulfate (Sigma). The suspension was centrifuged

for 30 minutes at 35000 g. The first step of protein purification consisted of an ammonium sulfate precipitation to 50% of saturation for 3 h followed by centrifugation for 30 min at 25000 g, the supernatant was brought to 77% ammonium sulfate saturation and proteins were precipitated under stirring overnight before centrifugation. The precipitate was redissolved in 5 mL 0.1M Tris/HCl pH = 8 containing 10% v/v glycérol. Homogeneous Fur1-82 was obtained after a gel filtration on a Superdex 75 HR 16/60 (Amersham Biosciences) equilibrated with 0.1 M Tris/HCl pH = 8.0 1 M KCl. Pure protein fractions, as revealed by SDS-PAGE and mass spectrometry, were pooled and concentrated with Ultrafree (5K Millipore). Protein concentration was determined with the BCA assay (Biorad) using a FUR and a BSA calibration curve. The yield was 30 mg of pure protein per liter of bacterial culture.

Crystallization conditions and structure determination of the truncated Fur 1-82

Screening of the crystallization conditions was initially performed with a TECAN robot at the IBS using various commercial screens of Hampton Research and Qiagen. Crystals were obtained at 20°C in 100 mM sodium acetate pH 4.6 30% (v/v) PEG 400 containing 100 mM CdCl₂ of the screen the classic suite from Qiagen. Crystals were then optimized and grown at 20°C from a 1:1 µL mixture of 10 mg/mL protein solution with 100 mM sodium acetate pH = 4.6 30% (v/v) PEG 200 containing 100 mM CdCl₂. For data collection, the crystals were transferred into a solution composed of the mother liquor containing 25% glycerol as cryoprotectant. X-ray crystallography was then used to obtain the three-dimensional structure of Fur1-82 at high resolution.

The structure was determined using Molecular Replacement technique using a dataset at 1.8 Å resolution collected on beamline FIP-BM30A of ESRF (11). Data reduction was done by the XDS program (12). The space group was P2₁2₁2 (a = 38.50 Å, b = 159.27 Å, c = 28.65 Å) with potentially two molecules per asymmetric unit (solvent content of 48 %). The Molecular Replacement has been performed with the Phaser program (13) using the model of the 84 first amino acids of the *P. aeruginosa* protein (pdb code 1MZZB). The first model obtained with Phaser was then introduced in ARP-WARP (14)

with the *E. coli* Fur sequence. ARP_WARP built 139 amino acids over the 164 present in the asymmetric unit and the remaining amino acids have been incorporated with the coot program (15). Refinements of the different models were carried out with the Refmac5 program of the CCP4 Suite (16) in the 30-1.8 Å resolution range without any NCS restraints. The final model contains residues 1 to 83 from each monomer present in the asymmetric unit as well as 180 water molecules. The presence of two molecules of Fur1-82 per asymmetric unit as a dimer is probably a crystallization artefact since the DNA recognition helices are face to face in the dimeric arrangement. The dimer is formed due to the presence of 2 Cd(II) cations that bound amino acids of the two monomers. All residues fall within the allowed regions of the Ramachandran plot as defined by the Procheck program (17). Statistics for all the data collections and refinement of the different structures are summarized in Table 1. The atomic coordinates and structure factors for N-terminal domain of Fur have been deposited with the Brookhaven Protein Data Bank under the accession number 2FU4.

NMR sample preparation

Uniformly labeled $^2\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ - and $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ - Fur was obtained by overexpression in the *E. coli* strain BL21(DE3). Bacteria freshly transformed with pET-30-Fur were grown at 37°C in M9 minimal medium containing 1 g/L of $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ and 2 g/L of ^{13}C -glucose with or without $\approx 95\%$ D_2O and supplemented with MnCl_2 (0.1 mM), ZnSO_4 (0.05 mM), FeCl_3 (0.05 mM) and a vitamin solution (18). ^{15}N - Fur1-82 was obtained using the same procedure with minimal medium containing $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$.

For deuterated Fur, 20 mL of LB medium prepared with 50% D_2O were inoculated with a colony of freshly transformed bacteria and cells were grown at 37°C to saturation overnight. Bacteria were harvested at 1500 g, washed twice with 20 mL of cold M9 medium and resuspended in a final volume of 100 mL of $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labelled M9 medium prepared with $\approx 95\%$ D_2O . Growth occurred overnight at 37°C. Cells were harvested at 1500 g and re-suspended in 1 L of $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labelled M9 medium in $\approx 95\%$ D_2O . The culture was incubated at 37°C. Expression of the Fur

protein was induced with 0.5 mM IPTG when the $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ reached a value of 0.5. Cells were kept at 37°C for 5 hours and were finally harvested and stored frozen at -80°C until protein purification.

An additional NMR sample of highly deuterated Fur was also prepared using a commercial triple-labeled medium (OD2 medium from Silantes, Germany). After two 10 mL precultures in LB medium prepared with 100% D_2O , 40 mL of triple-labeled OD2 medium were inoculated with 400 μL of cell suspension and incubated overnight at 37°C. Cells were harvested at 1500 g and resuspended in 920 mL of Silantes OD2 medium. Protein expression was induced by IPTG (final concentration of 0.5 mM) at 37°C at an $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ of 0.8 for five hours before harvesting the cells.

For the NMR experiments, the buffer was exchanged to 0.1 M MOPS/NaOH 0.5 M KCl pH = 7.5 using NAP 10 columns (Amersham Biosciences). D_2O 7% and either DTT (10 mM, Fur dimer) or EDTA (20 mM, Fur monomer) were added to the sample after the buffer exchange step.

The high KCl concentration employed was necessary to prevent protein oligomerization at high concentrations (see former paper in this issue (1)). NMR sample concentrations varied between 1.5 and 2.5 mM. All NMR samples were prepared in a glove box under argon and sealed in the NMR tubes.

NMR spectroscopy

All NMR experiments were performed at 298 K on VARIAN INOVA 600 and 800 spectrometers equipped with triple resonance (^1H , ^{15}N , ^{13}C) probes including shielded z-gradients. The data were processed using Felix 2000 (Accelrys) and the resonance assignment was achieved using the ALPS program (19). HNCO, HN(CA)CO, HN(COCA)CB, HN(CA)CB pulse sequences were provided by the Varian protein pack. The 3D MQ-HNCOCA (20) and the 3D MQ-COHNCA (21) were performed as described in the literature. The secondary structure elements were identified from secondary $^{13}\text{C}'$ and $^{13}\text{C}\alpha$ chemical shifts (22). In the case of the dimeric protein, two NOESY experiments were recorded at 600 MHz to deduce the topology of the β -strands: an ^{15}N -edited NOESY-HSQC with a

mixing time of 140 ms and a ^{15}N -HSQC-NOE- ^{15}N -HSQC with a mixing time of 50 ms. Both experiments were performed on the highly deuterated Fur sample. For the sidechain assignment of the dimeric protein, (H)C(CO)NH-TOCSY and H(CCO)NH-TOCSY experiments were acquired at 600 MHz as well as (H)CCH-TOCSY and H(C)CH-TOCSY experiments at 800 MHz (pulse sequences provided by the Varian Protein Pack). $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE were measured at 600 MHz using a standard 2D pulse sequence (23). Two spectra with on and off resonance ^1H saturation were recorded in an interleaved manner. The saturation time and the recycle delay were set to 4 s and 7 s respectively. Only well resolved peaks were taken into account for the intensity measurements.

Resonance assignments for Zn_5FurD and monomeric Fur have been deposited with the BMRB data bank under the accession numbers 6947 and 6948, respectively.

Zinc titration of monomeric Fur

20 molar equivalents of DTT were added to a solution of 0.8 mM monomeric ^{15}N -labelled Fur in 0.1 M MOPS/NaOH 0.5 M KCl, pH = 7.5. Up to 1.5 molar equivalents/monomer of ZnSO_4 dissolved in water were then added drop by drop by steps of 0.5 molar equivalents to the sample in an NMR tube before recording ^1H , ^{15}N -HSQC spectra.

Results

After the metal-chelating column and subsequent treatment with EDTA, non-activated or Zn_5FurD protein is eluted from the gel filtration column under different oligomeric forms: oligomers (tetramers hexamer/octamer), dimer and monomer. The ratio of dimer to higher order oligomers depends on pH and salt concentration and the monomeric form can be converted to a dimeric form by reduction of the disulfide bridge by DTT and incorporation of Zn(II). Monomeric and dimeric species were purified separately since they are not in equilibrium in absence of DTT and zinc (see previous paper (1)). Here we describe the structural properties of the dimeric and monomeric forms using NMR and X-ray crystallography and we investigate the structural

changes related to the monomer-dimer conversion.

The ^1H , ^{15}N -HSQC spectra of the two forms are shown in Figure 1. The spectrum of the dimeric protein shows approximately 150 peaks, from which it can be concluded that Zn_5FurD forms a symmetric dimer, in agreement with the *P. aeruginosa* crystal structure (8). Even if we consider a variation of the chemical environment for residues at the dimer interface, the spectra obtained for the monomer and the dimer are too different for the two species to expect the same 3D structure. Especially, it can be seen that the spectrum of the monomeric protein is less extended both in the proton and in the nitrogen dimension, indicating a lower degree of structuration of the monomer compared to the dimer.

However, under our NMR experimental conditions, Fur dimer, prepared in the absence of DTT and without strictly respecting anaerobic conditions, slowly and irreversibly formed some monomeric species. To avoid formation of the monomer, DTT was added to the Fur dimer samples to maintain the cysteines in their reduced form. Furthermore, to avoid formation of oligomeric Fur in the NMR dimer samples, they were prepared in 0.5 M KCl at pH = 7.5. The monomeric sample appears stable with time and only shows some proteolytic degradation after several days at room temperature.

NMR characterization of non-activated Fur-dimer (Zn_5FurD)

Using standard 3D-NMR experiments, 91% of the backbone resonances could rapidly be assigned. No resonance assignments could be obtained for the five N-terminal residues as well as V67, G74, H86, H87, D104, S105 and K116 residues. The secondary chemical shifts derived from the difference between the experimental chemical shift and the one corresponding to a random coil conformation for a specified amino-acid, indicate the presence of four α -helices (residues 18 to 24, 35 to 44, 51 to 62, and 106 to 114) and five β -strands (residues 66 to 71, 77 to 82, 88 to 91, 97 to 102, and 119 to 131) which are detailed in Figure 2a. The first three helices and the subsequent two β -strands belong to the winged helix-turn-helix motif required for DNA interaction (24). However, the crystal structure of

P. aeruginosa Fur contains an additional N-terminal helix (8) which we do not observe for the Zn₅FurD protein in solution..

271 and 196 NOE between amide groups were identified from the ¹⁵N-edited NOESY-HSQC and the ¹⁵N-HSQC-NOE-¹⁵N-HSQC, respectively. This allowed us to deduce the topology of the β sheets: strands β 1 and β 2 as well as β 3 and β 4 form two short antiparallel sheets whereas the NOE observed in the last strand can only be explained by the presence of an antiparallel inter-subunit β sheet at the dimer interface. These observations are in good accordance with the crystal structure of the Zn(II)-activated *P. aeruginosa* Fur protein (8) with the exception of the N-terminal helix preceding the winged helix-turn-helix motif.

Unfortunately, further structural investigations of the protein by NMR were made impossible by the very unfavorable relaxation properties of this protein. The difficulty of the NMR study of Fur was already described in the literature (25-27). Only about 40% of the sidechain resonances could confidently be assigned. Attempts to obtain additional structural information from ¹³C-edited NOESY spectra failed. ¹⁵N-relaxation measurements revealed that the ratio of transversal and longitudinal relaxation rates was much higher than expected from the molecular mass of 34 kDa (results not shown) and we suppose that under our experimental conditions, there is still some amount of oligomeric protein formed in the sample during data acquisition.

NMR characterization of Fur-monomer

In case of the monomeric Fur, the backbone resonance assignment could easily be achieved for the N terminal domain. Four α -helices (residues 5 to 9, 17 to 24, 35 to 44, and 51 to 63) and two β -strands (residues 67 to 71, and 76 to 80) were deduced from the analysis of the secondary chemical shift values (Figure 2b). The C terminal domain (residues 81 to 147) was difficult to assign and 26 residues out of 67 could not be identified. Moreover, 16 peaks were missing in the ¹H, ¹⁵N-HSQC, indicating that the monomer probably undergoes conformational exchange. The secondary chemical shifts do not indicate any well-defined secondary structure

elements in the C-terminal domain, which is known to be involved in the dimer interface.

Compared to Zn₅FurD, the N terminal domain has globally the same secondary structure except for the first residues, for which the secondary chemical shifts reveal the presence of an additional α -helix (residues 5 to 9), situated N-terminal to the helix-turn-helix motif, analogous to the one seen in the *P. aeruginosa* protein.

Comparison of monomeric and dimeric species

The comparison of the backbone chemical shifts between monomer and dimer is shown in Figure 2e. It can be seen that there are no or only very weak deviations in the region corresponding to the helix-turn-helix motif (residues 14 to 65), suggesting that the local structure of this part of the protein is not influenced by the dimerization. On the other hand, there are significant differences for the C-terminal half and for the 18 N-terminal residues, regions for which the analysis of the secondary chemical shift has already indicated very different structural behavior (see Figures 2 a et b). In order to confirm the structural flexibility of the C-terminal domain in the monomeric species and to obtain further information on the intriguing changes in secondary structure in the N-terminal part between mono- and dimer, {¹H}-¹⁵N heteronuclear NOE (hetNOE) spectra were recorded for both forms. The hetNOE allows us to obtain information on the reorientation of the amide bond on the pico- to nanosecond timescale. Generally, {¹H}-¹⁵N hetNOE values above 0.7 indicate that the N-H vector is rigid with respect to the rest of the protein, whereas smaller values are due to increased backbone mobility.

In both the dimer and the monomer, residues previously determined to be situated in secondary structure elements are characterized by {¹H}-¹⁵N hetNOE values greater than 0.7 (Figures 2 c and d). However, even in the more structured dimer, loops connecting the secondary structure elements are found to be quite flexible with {¹H}-¹⁵N hetNOE values below 0.5. In addition, both the N-terminal and the C-terminal residues appear mobile in the dimeric Fur protein. The low {¹H}-¹⁵N hetNOE values measured for the 15 N-terminal residues confirm the absence of the additional N-terminal helix identified in the monomeric protein. So, overall, dimeric non-

activated Fur does not appear as a structurally well-ordered protein, which may explain the difficulties in getting crystals for X-ray analyses. In the monomeric protein, the N-terminal DNA-binding domain appears to be rigid, including residues 6 to 10, thus confirming the presence of an additional α -helix. On the contrary, the C-terminal domain is characterized by $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N hetNOE values below 0.5, demonstrating its poorly structured nature.

Monomer to dimer conversion

In the dimer, the four cysteines are reduced in contrast to the monomer, in which they were found oxidized (paper in this issue (1)) and involved in disulfide bridges between cysteines Cys92 and Cys95 on one hand and Cys132 and Cys137 on the other hand. We found that formation of dimer required reduction of the disulfide bridges and incorporation of Zn(II) but reduction of the four cysteines by DTT alone did not promote dimerization (1). We further investigated the structural changes following reduction of cysteine and addition of Zn(II) ions using NMR. ^1H , ^{15}N -HSQC spectra of the monomer recorded in the absence or presence of DTT are shown in Figure 3a. These spectra indicate that no major structural changes occur upon reduction. Only a few ^1H , ^{15}N -correlation peaks shift, which are mostly located around the Cys132 and Cys137. The addition of Zn(II) to the reduced monomer leads to the appearance of ^1H , ^{15}N -correlation peaks which belong to the dimer spectrum. Under non-saturating conditions with zinc, the ^1H , ^{15}N -HSQC spectra of both forms coexist, indicating that both forms are in slow exchange with respect to the NMR time-scale (compare Fig 3b). The spectrum obtained in the presence of 0.95 molar equivalent of Zn(II) still shows the presence of monomeric Fur, probably due to the excess of DTT also chelating competitively the Zn(II) in solution and thus decreasing the amount of metal available for the protein. It was not possible to completely saturate the zinc site of the Fur protein as at higher Zn(II) concentration, precipitation occurred. We therefore confirm that the incorporation of Zn(II) is essential for a large structural reorganization related to Fur dimerization and that the dimer formed from the reduced monomer is identical to the native dimeric protein.

Structural characterization of the truncated Fur: Fur1-82

As more detailed structural studies of the dimeric Fur protein were extremely difficult, we decided to further characterize monomeric Fur. A truncated protein formed only by the N-terminal DNA-binding domain was produced as the C-terminal domain has been shown to be disordered in monomeric Fur. ^{15}N -labeled truncated Fur1-82 was obtained and an ^1H , ^{15}N -HSQC spectrum acquired. Figure 4 shows the superposition of the ^1H , ^{15}N -HSQC spectra of monomeric and truncated *E. coli* Fur. These spectra are almost identical and we can therefore conclude that the structure of the isolated N-terminal domain is only slightly changed with respect to the corresponding fragment of monomeric Fur.

X-ray crystallography was then used to obtain the three-dimensional structure of Fur1-82 at 1.8 Å resolution, which is shown in Figure 5. The asymmetric unit includes two monomers with the interaction surface formed by helix 4 and strand 1. This interface, involving two cadmium ions, is certainly not biologically relevant as it contains helix 4, the DNA recognition helix. In addition, this dimeric form is incompatible with the native dimeric protein in which the C-terminal domain provides the inter-subunit interface (8). The structure of one subunit is composed of four α -helices (residues 3-10, 16-25, 35-45, 51-64) and two β -strands forming an anti-parallel sheet (66-72 and 76-82), a secondary structure composition identical to the one found in the dimeric, zinc-activated *P. aeruginosa* Fur (8). The structure of truncated *E. coli* Fur1-82 can be remarkably well superimposed with the N-terminal domain of the *P. aeruginosa* Fur protein, with an rmsd of 0.8 Å (calculated for 312 backbone atoms). Local variations of the backbone conformation are observed for two loops: the one connecting helix 2 and helix 3 and the turn between the two β -strands (Figure 5). It should be mentioned that the N-terminal helix of Fur1-82 is perfectly superimposed to the one in the *P. aeruginosa* Fur. In the truncated Fur1-82, residues from this helix are involved in hydrophobic contacts with L19, L22 on helix 2, F61, A64 on helix 4 as well as I66 and L12, both situated in loop regions. As also observed for the *P. aeruginosa* Fur, positively charged residues situated at the end of

the N-terminal helix (K8, K9 and K13 in *E. coli* Fur) contribute to a basic surface patch which can be assumed to be essential for protein-DNA interaction. Comparison of the electrostatic surfaces of *E. coli* Fur1-82 and *P. aeruginosa* Fur is shown in Figure S1 of the supplementary material. Again, these surfaces are very similar, indicating a conserved DNA-interaction mechanism.

Discussion

During the last two decades, numerous research groups have contributed interesting and complementary results on the structural and functional aspects of the Fur protein, one global transcriptional regulator ubiquitous in *Gram*⁻ bacteria. In 2003, the crystal structure of the Fur protein from *P. aeruginosa* has been published (8), providing the first detailed structural information on a molecular level. This structure corresponds to the zinc-activated protein, containing zinc in the two metal-binding sites (the structural zinc and the regulatory iron site). However, the biochemical data presented in our previous work (1,24) have shown that metal activation induces conformational changes, some of which were addressed in this NMR and X-ray study.

Figure 6 shows the sequence alignment of *P. aeruginosa* and the *E. coli* Fur together with the experimentally determined secondary structure elements. Comparing the structural information available from the solution study of dimeric, non-activated *E. coli* Fur with the crystal structure of *P. aeruginosa* Fur, we have shown that the overall architecture is conserved: the size, the localization and the topology of the secondary structure elements seem to be identical, as far as we can conclude from our NMR data. There is only one remarkable exception: the additional N-terminal helix, which has also been predicted from the *E. coli* Fur protein sequence. This helix is present in the activated *P. aeruginosa* protein but our results show that it is absent in the non-activated form of Fur from *E. coli*. We first thought that the presence of this helix in the *P. aeruginosa* crystal structure might be related to an altered N-terminus (addition of two residues resulting from the cleavage of the GST fusion protein) or to the crystal environment. However,

our observation of an analogous helix in the monomeric form of the *E. coli* Fur protein in solution as well as in the truncated Fur N-terminal domain demonstrates that this region is able to fold as an α -helix also in the *E. coli* protein. We thus became interested in this N-terminal helix and its possible role within the DNA-binding domain.

It has already been suggested by Pohl *et al.*, that the N-terminal helix is required for efficient DNA-binding (8). This is further supported by mutagenesis studies: for example, *P. aeruginosa* Fur, having Ala10 mutated to glycine, a much poorer helix former, was found to be unable to bind to the *pvdS* promoter (28), and in *E. coli* it has been shown that proteolytic cleavage of the 8 or 9 N-terminal residues resulted in a protein with reduced DNA-binding affinity and specificity (29). Comparing the sequences of different Fur proteins it can be seen that in addition to a highly conserved basic residue in the loop connecting the first two helices (Lys13 in *E. coli*), one or two lysine or arginine residues are often found at the end of the N-terminal helix. These lysine sidechains are surface-exposed and could thus be involved in DNA recognition and interaction. One can imagine that the folding of the N-terminal residues in an α -helical conformation stabilizes these sidechains in a position suitable for DNA recognition and interaction.

The absence of this N-terminal helix in the non-activated protein in solution together with the structural considerations mentioned above, suggests that the presence of the N-terminal helix is related to the activation state of the dimeric Fur protein. Metal-binding to the functional iron site would induce conformational changes resulting in the stabilization of the N-terminal residues in an α -helical conformation, thus optimizing DNA recognition and interaction. However, looking at the crystal structure of dimeric and activated *P. aeruginosa* Fur protein, it becomes difficult to imagine how the C-terminal regulation domain could communicate with the distant N-terminal helix in the DNA-binding domain. The results we obtained in this study on the three different forms of Fur may provide a clue for a possible activation mechanism of the Fur protein, involving the N-terminal helix. Comparison of the ¹H, ¹⁵N-HSQC spectra of the three forms indicates that the structure of the winged helix-

turn-helix motif (helices 2-4, strands 1 and 2) is independent of the state of the C-terminal domain : folded (Zn₅FurD), unfolded (Fur monomer) or absent (truncated Fur1-82). The only difference between these forms is the absence or presence of the additional N-terminal helix, which we have identified in the two monomeric forms (Fur monomer and truncated Fur1-82). From this observation we can conclude that it is the sole presence of the structured C-terminal domain in the dimeric non-activated protein, which triggers the unfolding of the N-terminal helix. The unfolded state of the corresponding residues has experimentally been demonstrated by the NMR relaxation measurements (compare Figure 2d). Furthermore, the EDC crosslinking experiments have shown the spatial proximity of the N-terminal amino group of one subunit and a carboxyl group within the C-terminal last 9 residues of the second (1). In addition, experiments using a DMA cross-linker demonstrated intersubunit contacts between the N-terminal extremity of one subunit and Lys76 and Lys97 (1). These contacts are not compatible with the crystal structure of activated *P. aeruginosa* Fur with an α -helical N-terminus (see Figure 7) but could be explained by a more elongated and flexible conformation of the N-terminal residues. Metal-binding to the C-terminal activation site abolishes effective intersubunit cross-links involving EDC as well as DMA (1), providing additional experimental evidence for the reorganization of the N-terminal residues. We therefore suggest that the activation of Fur proceeds by metal-binding to the C-terminal domain which triggers local conformational changes. This then unlocks the experimentally observed interactions with residues in the unstructured N-terminal part, leading to formation of helix 1 and thus of the DNA-recognition site involving the basic residues directly adjacent to this helix. This mechanism may involve a relative reorientation of the two subunits, which could contribute to the decrease of the distance between the N-terminus and parts of the other subunit.

To clarify this issue, additional structural studies of the non-activated form of the Fur protein are necessary. A structural characterization of this form would help to gain insight into the global structural reorganization

leading to such a drastic change in secondary structure due to the binding of the activating metal ion.

It should be mentioned that the presence of this additional N-terminal helix is very untypical for transcriptional regulators with a winged helix-turn-helix motif. Proteins of the MarR family like MarR (30) or MexR (31) have been shown to possess an extra N-terminal helix, but in these two proteins this helix is involved in dimerization by directly interacting with the C-terminal dimerization domain. To our knowledge, the implication of such an N-terminal helix in DNA recognition and the regulation of DNA-binding activity have never been reported in the literature and might be a unique feature of the Fur proteins. Besides the switch from the non-activated to the metal-activated form, Fur also undergoes a metal-induced, redox-controlled monomer-dimer transition which depends on Zn(II)-binding to the structural metal site. Using NMR spectroscopy we have shown that the monomer is characterized by an unstructured C-terminal dimerization domain and that addition of Zn(II) to the reduced monomer leads to the regeneration of Zn₅FurD. It has formerly been shown by EXAFS spectroscopy, that in *E. coli* Fur, the structural zinc is bound by two cysteine residues (7). They have been identified and correspond to Cys92 and Cys95 (32). One of these two cysteines is missing from the *P. aeruginosa* Fur protein and the crystal structure reveals that zinc is tetra-coordinated by four conserved amino acids: two histidines and two glutamic acids. In *P. aeruginosa* Fur, the zinc ligands are located both in the N- and in the C-terminal domain, holding together the two antiparallel β -sheets. In a homology-based structural model of *E. coli* Fur, Cys92 and Cys95 are situated in the loop connecting the two strands of the second antiparallel β -sheet and are far from the zinc-binding site in *P. aeruginosa* Fur (Figure 7). Thus, the zinc-binding site is clearly different from the one in *E. coli* Fur and may not be strictly conserved among the Fur proteins.

This observation is also confirmed by recent results obtained on the Fur protein from *Bradorhizobium japonicum*. Using atomic absorption spectroscopy, the authors showed that *Br. japonicum* Fur does not contain a structural zinc ion while they were able to correctly demonstrate the presence of zinc in *E. coli* Fur

(33). In addition, they performed mutagenesis studies in which the residues corresponding to either of the two metal-binding sites identified in the crystal structure have been mutated. These mutants still bind DNA with high affinity and repress transcription in an iron-dependent manner (31) which led the authors to suggest that the Fur protein might be a structurally and functionally more diverse protein than previously supposed. Looking at the sequence alignment of the Fur family (34) it can be realized that most of the Fur proteins in which the two cysteine residues corresponding to Cys92 and Cys95 in *E. coli* are conserved, also contain a second pair of cysteines in a C-terminal extension. The first of these two additional cysteines (Cys132) could be modeled in the three-dimensional structure for *E. coli* Fur and is separated by less than 8Å from Cys92 and Cys95 (Figure 7). From our results in *E. coli* Fur, we know that this cysteine is not implicated in zinc binding (32). However, in Fur-like proteins functioning as oxidative stress sensors, like FurS or PerR, the cysteine homologous to Cys132 in *E. coli* is found in a CX₂C motif in contrast to the CX₄C motif encountered in *E. coli*. It opens up the possibility that in the redox-sensing Fur-like proteins the structural zinc could be bound by two CX₂C motifs and forms a redox-active zinc site. The importance of zinc bound to sulfur ligands and its implication in redox regulation of important protein function has only very recently been recognized (35). In the case of the redox-sensing Fur-like proteins, oxidation of the cysteines in the zinc-binding site would result in the loss of zinc and the dissociation of the dimeric protein. This would then significantly diminish the DNA-binding affinity resulting in the dissociation of the protein from the promoter sequence. It has already been recognized that in the redox-sensitive FurS protein from *Streptomyces reticuli* the oxidation of sulfhydryl

groups induces the release of zinc (36). Redox-induced dimer dissociation could therefore represent an alternative mechanism for the control of the activity of redox-sensitive transcriptional regulator proteins. Dimer dissociation as a mechanism for the inactivation of a transcriptional regulator has already been reported for MecI and BlaI, proteins implicated in resistance to β -lactam antibiotics (31) and references cited therein, but in this case, the dimerization domain is proteolytically cleaved. In the case of *E. coli* Fur, the monomeric form is still metal-activable but has an apparent DNA-binding affinity which is five times lower than that of the dimer.

The structural results we obtained for the non-activated dimeric and the monomeric forms of *E. coli* Fur provide some new insights into the molecular basis of Fur activation due to metal binding to the regulatory iron site, implicating folding and unfolding of the untypical N-terminal helix. The observations we made on the monomeric protein led us to suggest a possible second regulation mechanism of the DNA-binding affinity for redox-sensing Fur proteins, implying a redox zinc switch at the structural zinc site leading to a monomeric protein with significantly reduced affinity for DNA. Comparison with the crystal structure of *P. aeruginosa* Fur provided evidence that the zinc site may not be strictly conserved among the Fur proteins and may have evolved in function of the specific requirements in the whole regulation network of a given bacterial strain. Further experimental data are required to verify these hypotheses and to obtain a more profound comprehension of the function of this still very challenging protein.

REFERENCES

1. D'Autréaux, B., Pecqueur, L., Diederix, R. E. M., Gonzalez de Peredo, A., Caux-Thang, C., Tabet, L., Bersch, B., Forest, E., and Michaud-Soret, I. (2006) *J. Biol. Chem.*, former paper in this issue
2. Hantke, K. (2001) *Curr Opin Microbiol* **4**, 172-177
3. de Lorenzo, V., Wee, S., Herrero, M., and Neilands, J. B. (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 2624-2630
4. Bagg, A., and Neilands, J. B. (1987) *Biochemistry* **26**, 5471-5477
5. Ochsner, U. A., Vasil, A. I., and Vasil, M. L. (1995) *Journal of Bacteriology* **177**, 7194-7201

6. Adrait, A., Jacquamet, L., Le Pape, L., Gonzalez de Peredo, A., Aberdam, D., Hazemann, J. L., Latour, J. M., and Michaud-Soret, I. (1999) *Biochemistry* **38**, 6248-6260
7. Jacquamet, L., Aberdam, D., Adrait, A., Hazemann, J. L., Latour, J. M., and Michaud-Soret, I. (1998) *Biochemistry* **37**, 2564-2571
8. Pohl, E., Haller, J. C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E., and Vasil, M. L. (2003) *Mol Microbiol* **47**, 903-915
9. D'Autreaux, B., Touati, D., Bersch, B., Latour, J. M., and Michaud-Soret, I. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16619-16624
10. Wee, S., Neilands, J. B., Bittner, M. L., Hemming, B. C., Haymore, B. L., and Seetharam, R. (1988) *Biology of Metals* **1**, 62-68
11. Roth, M., Carpentier, P., Kaïkati, O., Joly, J., Charraut, P., Pirocchi, M., Kahn, R., Fanchon, E., Jacquamet, L., Borel, F., Bertoni, A., Israel-Gouy, P., and Ferrer, J. L. (2002) *Acta Crystallographica*, 805-814
12. Kabsch, W. (1993) *J. Appl. Cryst.* **26**, 795-800
13. Read, R. J. (2001) *Acta Cryst. D* **D57**, 1373-1382
14. Perrakis, A., Harkiolaki, M., Wilson, K. S., and Lamzin, V. S. (2001) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 1445-1450
15. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-2132
16. Collaborative Computational Project, N. (1994) *Acta Cryst. D* **50**, 760-763
17. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-291
18. Jansson, M., Li, Y. C., Jendeborg, L., Anderson, S., Montelione, B. T., and Nilsson, B. (1996) *J Biomol NMR* **7**, 131-141
19. Morelle, N., Simorre, J. P., Caffrey, M., Meyer, T., Cusanovich, M., and Marion, D. (1995) *FEBS Lett* **365**, 172-178
20. Brutscher, B., Cordier, F., Simorre, J. P., Caffrey, M., and Marion, D. (1995) *J Biomol NMR* **5**, 202-206
21. Szyperski, T., Braun, D., Fernandez, C., Bartels, C., and Wüthrich, K. (1995) *J. Magn. Res.* **B108**, 197-203
22. Wishart, D. S., and Sykes, B. D. (1994) *J Biomol NMR* **4**, 171-180
23. Farrow, N. A., Zhang, O., Forman-Kay, J. D., and Kay, L. E. (1994) *J Biomol NMR* **4**, 727-734
24. Gonzalez de Peredo, A., Saint-Pierre, C., Latour, J. M., Michaud-Soret, I., and Forest, E. (2001) *J. Mol. Biol.* **310**, 83-91.
25. Saito, T., Duly, D., and Williams, R. P. J. (1991) *European Journal of Biochemistry* **197**, 39-42
26. Saito, T., and Williams, R. P. J. (1991) *European Journal of Biochemistry* **197**, 43-47
27. Saito, T., Wormald, M. R., and Williams, R. P. J. (1991) *European Journal of Biochemistry* **197**, 29-38
28. Barton, H. A., Johnson, Z., Cox, C. D., Vasil, A. I., and Vasil, M. L. (1996) *Mol Microbiol* **21**, 1001-1017
29. Coy, M., and Neilands, J. B. (1991) *Biochemistry* **30**, 8201-8210
30. Alekshun, M. N., Levy, S. B., Mealy, T. R., Seaton, B. A., and Head, J. F. (2001) *Nat Struct Biol* **8**, 710-714
31. Garcia-Castellanos, R., Mallorqui-Fernandez, G., Marrero, A., Potempa, J., Coll, M., and Gomis-Ruth, F. X. (2004) *J Biol Chem* **279**, 17888-17896
32. Gonzalez de Peredo, A., Saint-Pierre, C., Adrait, A., Jacquamet, L., Latour, J. M., Forest, E., and Michaud-Soret, I. (1999) *Biochemistry* **38**, 8582-8589
33. Friedman, Y. E., and O'Brian, M. R. (2004) *J Biol Chem* **279**, 32100-32105
34. Servant, F., Bru, C., Carrere, S., Courcelle, E., Gouzy, J., Peyruc, D., and Kahn, D. (2002) *Brief Bioinform* **3**, 246-251
35. Maret, W. (2004) *Biochemistry* **43**, 3301-3309

36. Ortiz de Orue Lucana, D., Troller, M., and Schrempf, H. (2003) *Mol Genet Genomics* **268**, 618-627
37. Guex, N., and Peitsch, M. (1997) *Electrophoresis* **18**, 2714-2723
38. Tiss, A., Barre, O., Michaud-Soret, I., and Forest, E. (2005) *FEBS Lett* **579**, 5454-5460

Footnotes

We are indebted to Rutger Diederix for critical reading of the manuscript and Caroline Fauquant for her help for the mutant construction.

Supplementary material containing a figure illustrating the electrostatic surfaces of *E. coli* Fur1-82 and one *P. aeruginosa* Fur is available

Abbreviations: DMA: dimethyl adipimidate; EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide Fur: Ferric uptake regulator; Zn₅FurD: dimeric Fur in the non-activated form, the functional iron-site being in-occupied; HSQC : Heteronuclear Single Quantum Spectroscopy; NOE: Nuclear Overhauser effect.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: ¹H, ¹⁵N-HSQC spectra of Zn₅Fur dimer (A) and Fur monomer (B). Both spectra have been acquired at 600 MHz and at a temperature of 25°C. Sample concentration was 2.0 mM for Zn₅FurD Fur and 1.5 mM for Fur monomer (see experimental part for the conditions).

Figure 2: NMR comparison of Zn₅Fur dimer and Fur monomer. A and B: Secondary structures determined from secondary chemical shift values observed for C' (open bars) and Cα (filled bars) in the dimer (A) and in the monomer (B). C and D: Heteronuclear NOE values determined for Zn₅FurD (C) and Fur monomer (D) at 600 MHz and 25°C. E. Chemical shift difference (FurM-Zn₅FurD) for backbone HN (white bars) and N (black bars) between the two forms. For each form, the secondary structure elements as determined from chemical shift analysis are given.

Figure 3: Monitoring reduction and zinc-titration of Fur monomer by NMR. (A) Superposition of the ¹H, ¹⁵N-HSQC spectra of the oxidized (black) and reduced monomer (red). The annotated peaks correspond to residues that move after the addition of 1 equivalent of DTT. (B) Addition of zinc to DTT-

reduced Fur-monomer leads to the appearance of the Zn₅FurD ¹H, ¹⁵N-HSQC spectrum. The correlation peaks of reduced Fur monomer before and after the addition of 0.9 molar equivalents of ZnSO₄ are shown in red and blue, respectively.

Figure 4: Comparison of the ¹H, ¹⁵N-HSQC spectra of monomeric Fur and truncated Fur1-82. The two spectra are superimposed with the spectrum of monomeric Fur shown in black and that of Fur1-82 in red. The black resonance peaks in the center of the spectrum belong to the unstructured C-terminal domain.

Figure 5: X-ray structure of truncated Fur1-82. Ribbon representation of *E. coli* Fur1-82 (green) superposed on the N-terminal domain of *P. aeruginosa* Fur. The structures have been superimposed using the SwissPdbViewer (37). Several sidechains of amino acids discussed in the text and the literature are shown: the Lys76 and the Tyr55 sidechains proposed to be in interaction with the DNA (24,38), the His32 bound to the structural zinc in *P. aeruginosa* Fur and Lys8, Lys9 and Lys13 proposed to be protected from methyl acetamidate reactivity upon DNA binding (24).

Figure 6: Sequence alignment of Fur from *P. aeruginosa* and *E. coli* and secondary structure comparison. Metal-binding ligands are in bold in the corresponding sequence: underlined bold for the regulatory iron site and bold for the structural zinc site. Experimentally determined secondary structure elements are indicated with E for β -strands, H for α -helices and - for unstructured. Blanks correspond to unassigned residues in *E. coli* Fur.

Figure 7: Structural model of activated *E. coli* Fur. The two different subunits are shown in different blue tones, the N-terminal α -helices are indicated in green and the β -strands in red. The two zinc atoms present in each subunit of *P. aeruginosa* Fur structure are shown and the Cys92 and Cys95 residues which have been shown to participate to the structural zinc site in *E. coli* Fur are represented in detail. The localization of the Cys 92, Cys95 and Cys132 side chains are deduced from a homology model of *E. coli* Fur created with SwissModel (37) from the *P. aeruginosa* Fur structure, in which only Cys92 is conserved. The experimentally observed cross-links with DMA and EDC are indicated by the dotted and dashed arrows respectively. Sidechains involved in intersubunit cross-links obtained on the non activated Fur are displayed.

Table 1: Data collection statistics

Figure S1: Electrostatic surfaces of *E. coli* Fur1-82 (left) and one *P. aeruginosa* Fur subunit (right). Both molecules are in the same orientation with the DNA-binding helix in the center as shown in the ribbon representation. Secondary structure elements of the N-terminal domain are indicated and helices are numbered I to IV, helix IV being the DNA-interaction helix. Note that for *P. aeruginosa* Fur, the whole subunit is shown, including the C-terminal domain.

FIGURES AND LEGENDS

Figure 1

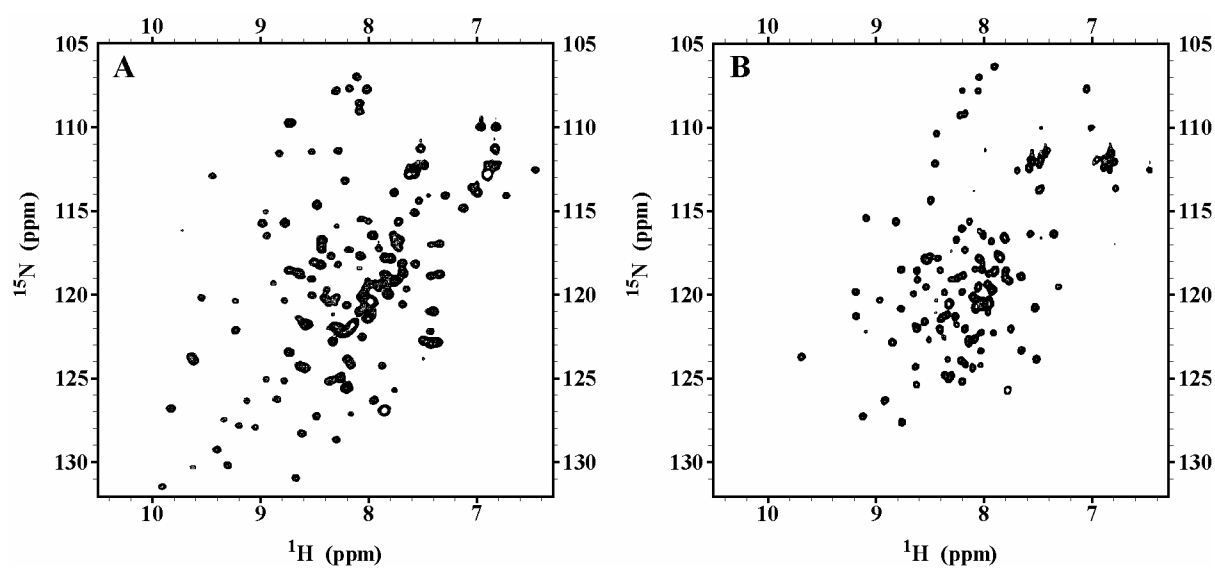


Figure 2

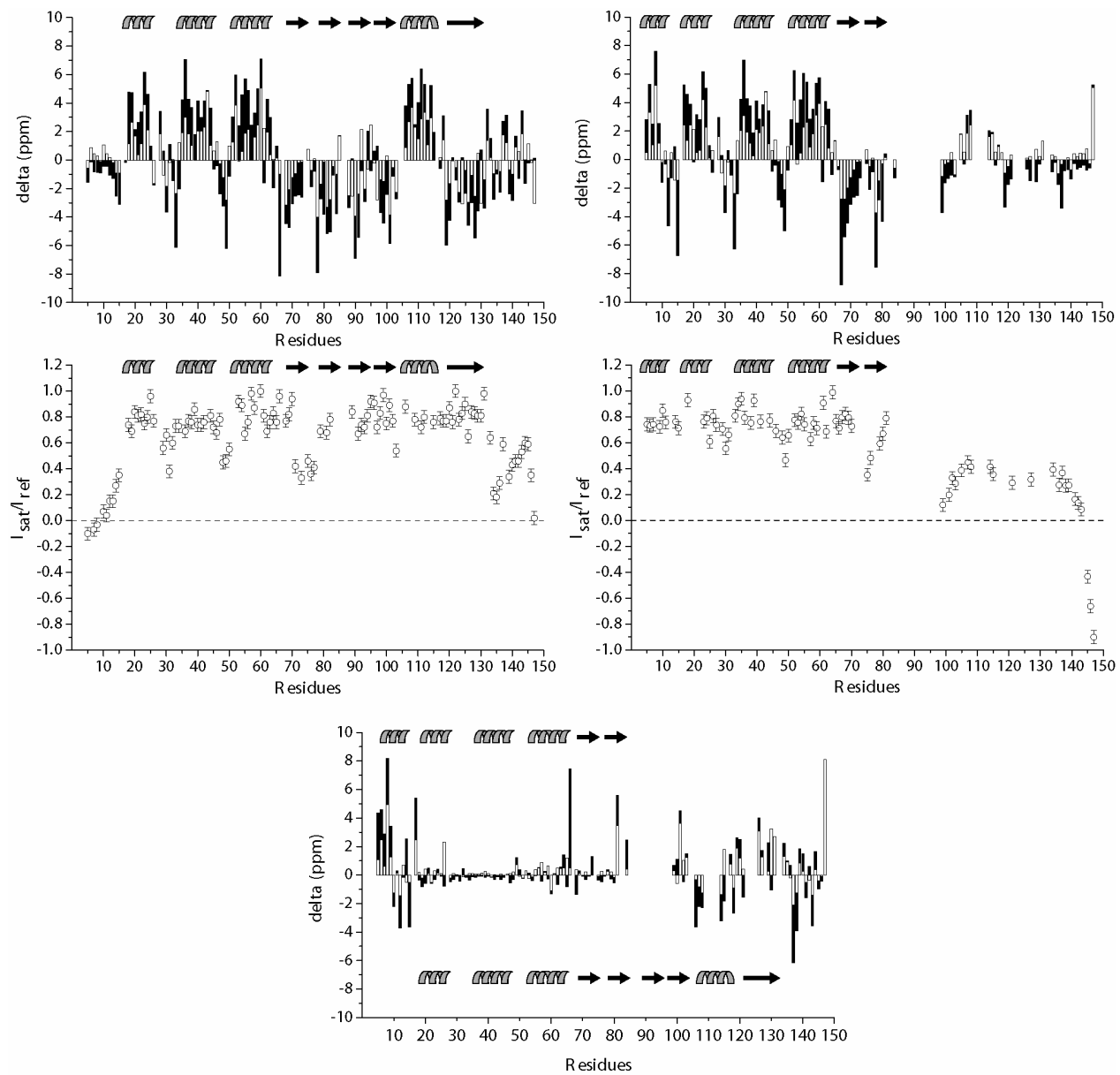


Figure 3

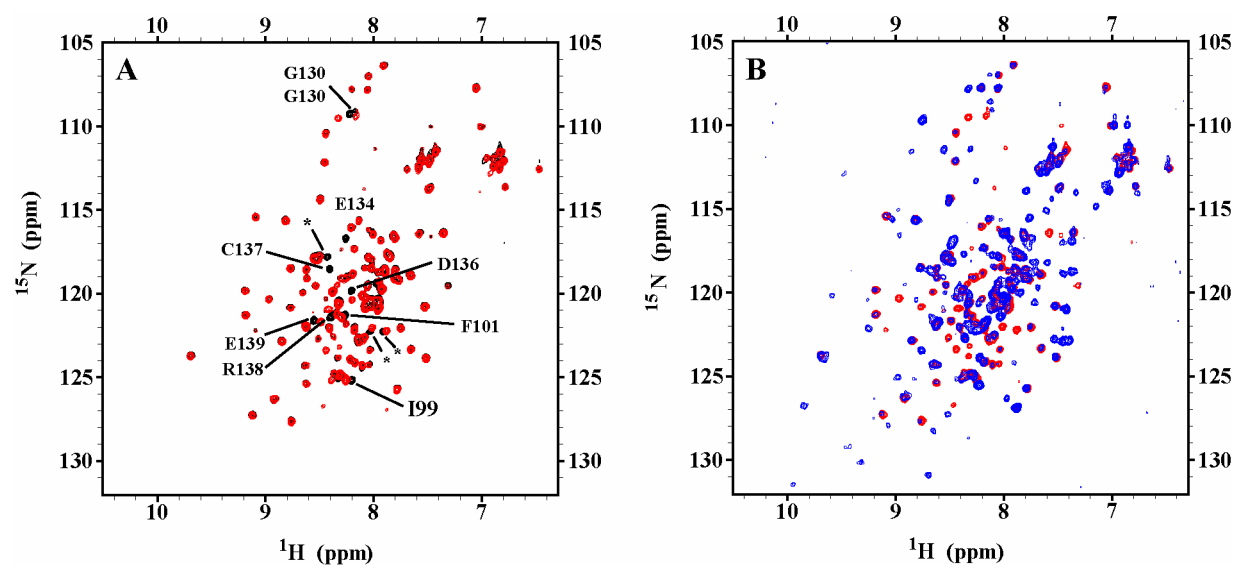


Figure 4

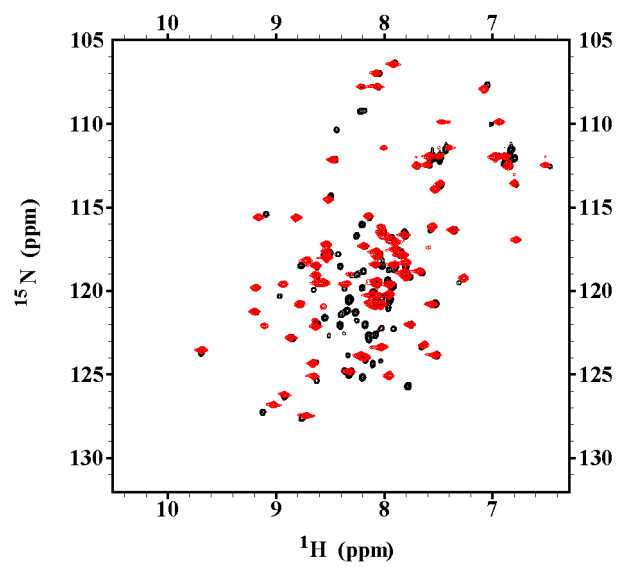


Figure 5

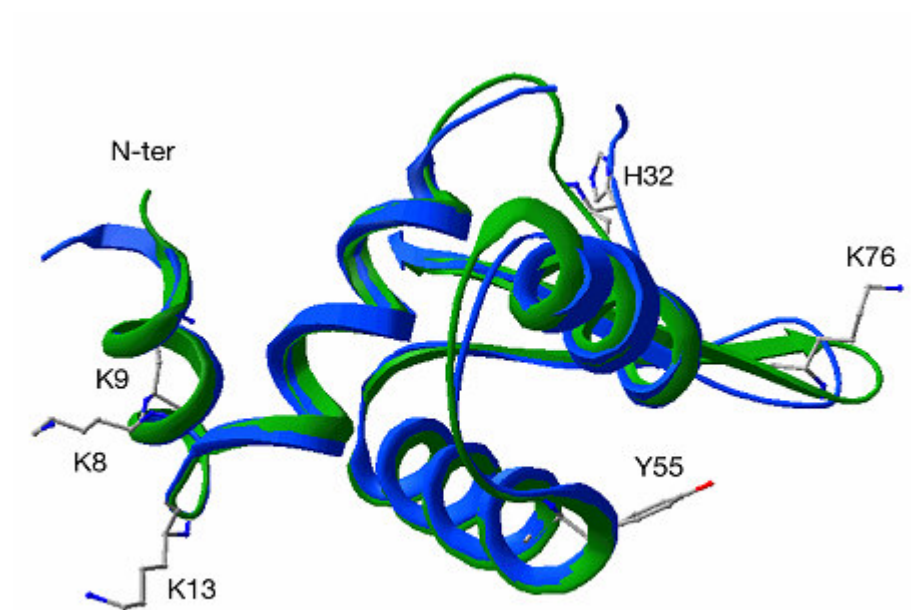


Figure 6

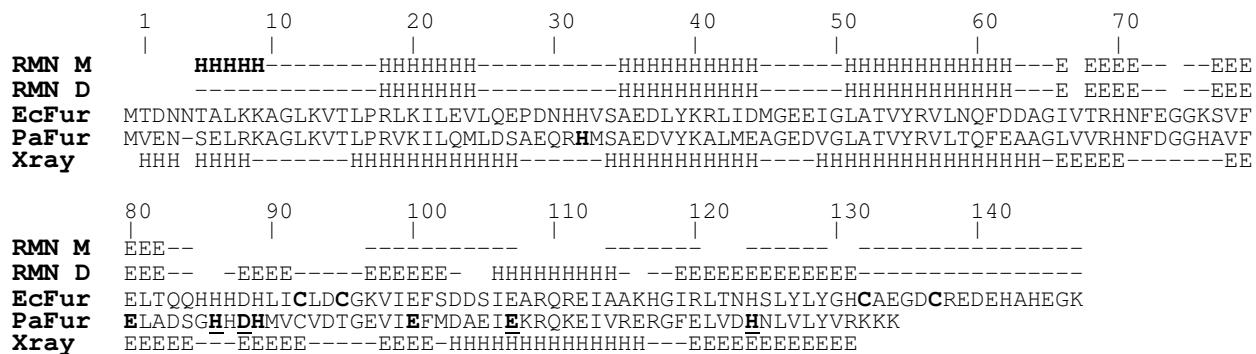


Figure 7

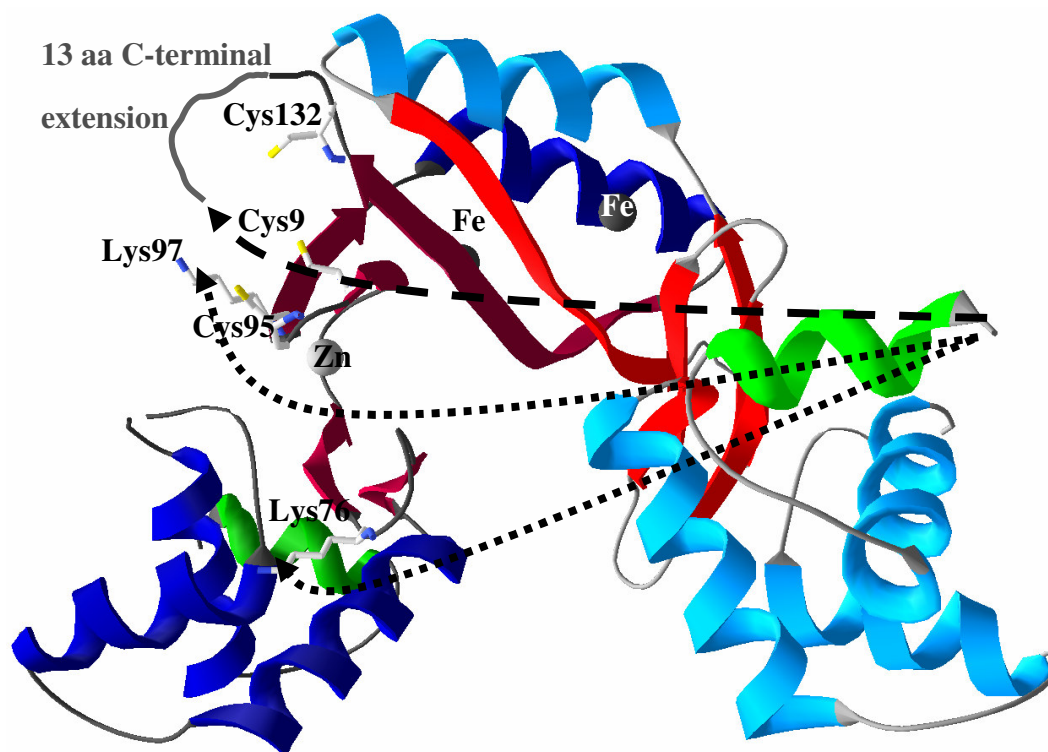
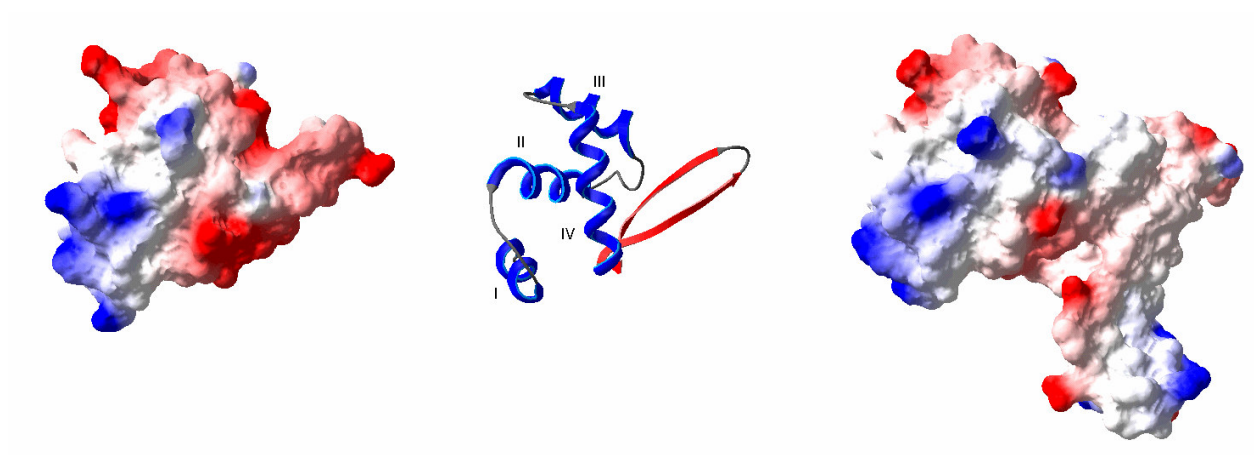


Table 1 :

Data collection	
Resolution (Å) ¹	50-1.8(1.9-1.8)
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2
Unit cell parameters	a=38.5 Å; b= 159.1 Å; c=28.6 Å.
Total number of reflections	145937
Total number of unique reflections	17195
R _{sym} (%) ¹	9.2 (32.9)
Completeness (%) ¹	99.4 (97.1)
I/σ(I)	17.72 (6.19)
Redundancy	8.5
Refinement	
Resolution (Å)	28-1.8
R (%)	17.2
R _{free} (%)	21.5
Structure quality	
R.m.s.d. bonds (Å)	0.011
R.m.s.d. angles (°)	1.276
¹ Number in parentheses are for highest resolution shell. ² $R_{\text{merge}} = \sum_h \sum_i I_{hi} - \langle I_h \rangle / \sum_h \sum_i I_{hi}$, where I_{hi} is the i th observation of the reflection h , while $\langle I_h \rangle$ is the mean intensity of reflection h . ³ $R_{\text{factor}} = \sum F_o - F_c / F_o $. R_{free} was calculated with a small fraction (5%) of randomly selected reflections.	

Figure S1.



Annexe B

Table 1 : resonance assignments of the dimer; (proton chemical shifts are given in parentheses).

residue	N	C	C ^α	C ^β	other
T1					
D2					
N3					
N4		175.86	53.24	38.21	
T5	114.56 (8.09)	174.62	62.10 (4.24)	68.87 (4.22)	C ^{γ2} , 21.13
A6	125.56 (8.20)	177.96	52.36 (4.29)	18.52 (1.39)	
L7	120.45 (7.98)	177.55	54.85 (4.28)	41.32	C ^γ , 26.70 (1.60); C ^{δ1} , 23.03 (0.83); C ^{δ2} , 24.30 (0.89)
K8	121.82 (8.14)	176.77	55.84 (4.29)	32.21 (1.77, 1.82)	C ^γ , 24.47 (1.46, 1.39); C ^δ , 28.59; C ^ε , 41.60 (2.99, .); N ^ζ , .
K9	122.31 (8.24)	176.41	55.89 (4.29)	32.26 (1.82, .)	C ^γ , 24.24 (1.41, 1.45); C ^δ , 28.62 (1.75); C ^ε , 41.70 (2.98).
A10	124.93 (8.25)	178.16	52.07 (4.34)	18.82 (1.39)	
G11	107.82 (8.30)	174.05	44.95 (3.94, .)		
L12	121.56 (8.01)	177.26	54.63 (4.34)	42.10 (1.59, .)	C ^γ , 26.51 (1.60); C ^{δ1} , 23.26 (0.87); C ^{δ2} , 24.46 (0.93)
K13	122.82 (8.33)	176.33	55.57 (4.36)	32.27 (1.80, .)	C ^γ , 24.28 ; C ^δ , 28.46
V14	122.13 (8.18)	176.19	61.38 (4.20)	32.54 (2.03)	C ^{γ1} , 20.38 ; C ^{γ2} , . (0.89)
T15	120.22 (8.30)	174.28	60.90 (4.44)	69.28 (4.14)	C ^{γ2} , 21.20 ;
L16	125.16 (8.39)	176.73	51.95	.	C ^γ , . ; C ^{δ1} , . ; C ^{δ2} , .
P17	.	175.97	62.77	27.33	C ^γ , . ; C ^δ , .
R18	120.32 (8.37)	177.65	59.92	29.99	C ^γ , . ; C ^δ , . ; C ^ε , . N ^ε , . ; N ^{η1} , . (*, *) ; N ^{η2} , . (*, *) ;
L19	117.24 (8.17)	179.73	57.80 (4.05)	39.98 (1.72, .)	C ^γ , 27.95 (1.73); C ^{δ1} , 23.02 (0.70); C ^{δ2} , 23.35 (0.77)
K20	119.32 (7.86)	178.20	57.14	30.80	C ^γ , . ; C ^δ , . ; C ^ε , . ; N ^ζ , .
I21	117.02 (7.44)	177.25	64.91 (3.58)	36.39 (1.85)	C ^{γ1} , 30.57 ; C ^{γ2} , 16.60 (1.02); C ^{δ1} , 13.40 (0.61)
L22	119.55 (7.99)	178.26	57.94 (3.95)	41.30 (1.62, .)	C ^γ , . ; C ^{δ1} , 24.03 (0.58); C ^{δ2} , 24.44 (0.71)
E23	117.70 (8.07)	179.98	59.00 (3.93)	28.88 (2.19, .)	C ^γ , 35.95 ; C ^δ , .
V24	118.24 (7.58)	179.20	65.52 (3.78)	30.93	C ^{γ1} , 22.45 (1.02); C ^{γ2} , 22.24 (0.90)
L25	119.31 (7.94)	177.09	56.68	42.07	C ^γ , . ; C ^{δ1} , . ; C ^{δ2} , .
Q26	114.44 (7.53)	176.65	55.51 (4.20)	28.91 (2.10, .)	C ^γ , 34.44 (2.31, 2.56); C ^δ , . N ^{ε2} , .
E27	122.74 (7.50)	176.92	54.83	.	C ^γ , . ; C ^δ , .
P28	.	177.83	64.49	31.22	C ^γ , 26.90 ; C ^δ , .
D29	114.62 (8.48)	176.14	54.72 (4.52)	39.75 (2.57, .)	
N30	117.89 (7.80)	173.25	51.78 (4.87)	38.13 (2.79, .)	N ^{δ2} , . ;
H31	117.57 (7.49)	174.92	56.88 (4.54)	29.38 (3.10, .)	C ^{δ2} , . ; C ^{ε1} , . ; N ^{δ1} , * ; N ^{ε2} , . ;
H32	115.66 (7.75)	175.17	54.33 (4.95)	30.97 (2.76, .)	C ^{δ2} , . ; C ^{ε1} , . ; N ^{δ1} , * ; N ^{ε2} , . ;
V33	118.59 (8.74)	174.74	59.24 (4.86)	34.52 (2.14)	C ^{γ1} , 20.92 (1.01); C ^{γ2} , 21.11 (0.92)
S34	122.11 (9.24)	174.91	56.26	65.41	
A35	123.69 (9.64)	179.03	54.82 (3.51)	16.76 (0.62)	
E36	115.64 (8.77)	179.10	60.75	27.83	C ^γ , 37.52 (2.59, 2.29); C ^δ , .
D37	121.01 (8.09)	179.05	56.51	39.52 (2.93, .)	
L38	124.17 (8.17)	178.12	58.37 (3.84)	40.82 (1.74, .)	C ^γ , . (1.60); C ^{δ1} , 25.35 ; C ^{δ2} , .
Y39	119.05 (8.52)	175.71	60.39	38.45 (3.25, .)	C ^{δ1} , . ; C ^{δ2} , . ; C ^{ε1} , . ; C ^{ε2} , . ; C ^ζ , .
K40	117.86 (7.85)	178.51	58.84	31.47	C ^γ , . ; C ^δ , . ; C ^ε , . ; N ^ζ , .
R41	118.64 (7.68)	178.51	57.28	27.87	C ^γ , 26.64 ; C ^δ , 41.82 ; C ^ε , . N ^ε , . ; N ^{η1} , . (*, *) ; N ^{η2} , . (*, *) ;
L42	119.11 (8.01)	179.41	57.53	40.00	C ^γ , . ; C ^{δ1} , . ; C ^{δ2} , .
I43	119.97 (8.05)	181.70	62.69 (3.92)	35.40 (1.86)	C ^{γ1} , 26.56 ; C ^{γ2} , 16.75 (0.91); C ^{δ1} , 10.02 (0.57)
D44	123.82 (8.20)	178.23	56.73 (4.39)	39.76 (2.69, 2.92)	
M45	116.76 (7.72)	176.44	55.96	33.56	C ^γ , 31.23 ; C ^ε , .
G46	107.76 (8.01)	174.91	44.61		
E47	118.87 (7.85)	175.85	54.55	29.18	C ^γ , 35.30 ; C ^δ , .
E48	123.48 (8.73)	174.88	54.70	28.38	C ^γ , 35.70 ; C ^δ , .
I49	122.98 (7.43)	174.08	59.20 (4.37)	40.60 (1.65)	C ^{γ1} , 27.36 ; C ^{γ2} , 16.67 (1.23); C ^{δ1} , 14.48 (0.80)
G50	111.32 (8.27)	174.57	43.86 (3.97, 4.45)		
L51	125.27 (8.36)	178.34	57.51	39.80	C ^γ , . ; C ^{δ1} , . ; C ^{δ2} , .
A52	118.63 (8.65)	180.95	54.61 (3.94)	17.06	
T53	117.02 (7.35)	175.09	65.51 (3.77)	67.23 (3.85)	C ^{γ2} , 22.46 ;
V54	122.18 (7.43)	177.69	67.00	30.40 (2.24)	C ^{γ1} , 21.50 (0.71); C ^{γ2} , 23.11 (0.92)
Y55	115.62 (8.00)	177.58	62.42	37.93 (2.61, .)	C ^{δ1} , . ; C ^{δ2} , . ; C ^{ε1} , . ; C ^{ε2} , . ; C ^ζ , .
R56	119.19 (7.75)	178.63	59.07	29.04	C ^γ , . ; C ^δ , . ; C ^ε , . N ^ε , . ; N ^{η1} , . (*, *) ; N ^{η2} , . (*, *) ;
V57	117.30 (7.73)	177.07	65.44	30.42 (1.49)	C ^{γ1} , 21.56 (-0.01); C ^{γ2} , 23.16 (0.62)
L58	117.20 (7.92)	178.71	57.38	39.48	C ^γ , 25.20 (1.20); C ^{δ1} , 20.67 (0.12); C ^{δ2} , .
N59	116.78 (8.42)	177.55	56.14	37.40	N ^{δ2} , . ;
Q60	119.61 (7.65)	181.34	58.26	26.61	C ^γ , . ; C ^δ , . N ^{ε2} , .
F61	120.34 (8.78)	178.01	56.30	36.13	C ^{δ1} , . ; C ^{δ2} , . ; C ^{ε1} , . ; C ^{ε2} , . ; C ^ζ , . ;
D62	125.19 (8.78)	179.16	56.43	41.06	
D63	120.20 (8.42)	177.56	56.73	40.03	
A64	114.88 (7.13)	177.14	50.53 (4.50)	20.31 (1.20)	
G65	109.13 (8.09)	173.73	45.85		
I66	118.50 (8.10)	175.58	62.70 (3.40)	39.02 (0.94)	C ^{γ1} , 29.10 ; C ^{γ2} , 15.15 (0.34); C ^{δ1} , 12.69 (-0.41)
V67	.	174.50	56.51 (4.99)	33.82 (2.22)	C ^{γ1} , 18.34 (0.71); C ^{γ2} , 21.76 (0.78)
T68	115.11 (8.96)	172.06	61.78 (4.32)	70.82 (3.68)	C ^{γ2} , 19.60 ;
R69	128.30 (8.62)	174.42	53.64	31.90	C ^γ , . ; C ^δ , . ; C ^ε , . N ^ε , . ; N ^{η1} , . (*, *) ; N ^{η2} , . (*, *) ;
H70	126.13 (8.86)	173.88	53.95	32.21	C ^{δ2} , . ; C ^{ε1} , . ; N ^{δ1} , * ; N ^{ε2} , . ;

N71	120.84 (8.57)	174.15	52.00	39.74	$N^{\delta 2}, . ;$
F72	121.85 (8.59)	175.64	55.60	40.79 (2.80, 3.26)	$C^{\delta 1}, . ; C^{\delta 2}, . ; C^{e 1}, . ; C^{e 2}, . ; C^{\zeta}, . ;$
E73	121.40 (8.64)	177.22	57.00 (4.14)	29.09	$C^{\gamma}, 35.67 ; C^{\delta}, .$
G74	.	175.63	45.01		
G75	107.75 (8.19)	174.36	44.98		
K76	121.07 (7.40)	175.77	55.54	32.80	$C^{\gamma}, 24.48 ; C^{\delta}, 28.50 ; C^{\epsilon}, 41.85 ; N^{\zeta}, .$
S77	118.30 (8.45)	173.81	57.51	64.88 (3.49, .)	
V78	116.82 (8.45)	173.11	59.06 (4.45)	35.10 (1.76)	$C^{\gamma 1}, 19.29 (0.63) ; C^{\gamma 2}, 21.45 (0.77)$
F79	119.46 (8.90)	174.10	56.86	41.83	$C^{\delta 1}, . ; C^{\delta 2}, . ; C^{e 1}, . ; C^{e 2}, . ; C^{\zeta}, . ;$
E80	118.80 (8.63)	175.98	53.01	34.03	$C^{\gamma}, 34.90 ; C^{\delta}, .$
L81	130.01 (9.29)	173.77	53.86	39.52	$C^{\gamma}, . ; C^{\delta 1}, 23.58 (0.78) ; C^{\delta 2}, 25.86 (0.70)$
T82	124.23 (7.87)	172.43	60.80 (4.37)	70.32 (3.81)	$C^{\gamma 2}, 21.24 ;$
Q83	125.43 (8.21)	175.87	55.57 (4.20)	28.59 (1.94, .)	$C^{\gamma}, 33.25 (2.22, 2.36) ; C^{\delta}, . N^{\epsilon 2}, .$
Q84	121.87 (8.58)	175.32	53.40 (4.54)	31.22	$C^{\gamma}, 32.92 (2.28, .) ; C^{\delta}, . N^{\epsilon 2}, .$
H85	124.84 (8.61)	176.77	55.84	32.21	$C^{\delta 2}, . ; C^{e 1}, . ; N^{\delta 1}, * ; N^{\epsilon 2}, . ;$
H86	122.31 (8.24)	176.40	55.88	32.55	$C^{\delta 2}, . ; C^{e 1}, . ; N^{\delta 1}, * ; N^{\epsilon 2}, . ;$
H87	.	173.93	54.86	.	$C^{\delta 2}, . ; C^{e 1}, . ; N^{\delta 1}, * ; N^{\epsilon 2}, . ;$
D88	120.24 (8.05)	174.69	53.26	40.77	
H89	113.56 (7.05)	172.55	55.91	33.03	$C^{\delta 2}, . ; C^{e 1}, . ; N^{\delta 1}, * ; N^{\epsilon 2}, . ;$
L90	127.42 (9.37)	173.18	52.70	42.59	$C^{\gamma}, . ; C^{\delta 1}, . ; C^{\delta 2}, .$
I91	127.87 (9.06)	174.51	59.54	40.27	$C^{\gamma 1}, 29.49 ; C^{\gamma 2}, 17.00 (1.12) ; C^{\delta 1}, 14.20 (0.77)$
C92	127.16 (8.18)	177.14	57.36	30.71	
L93	127.83 (9.19)	175.08	54.81	40.52	$C^{\gamma}, 24.11 ; C^{\delta 1}, . ; C^{\delta 2}, 20.29$
D94	120.25 (9.57)	176.57	56.12	41.63	
C95	115.55 (8.08)	177.46	57.36	32.02	
G96	115.89 (8.29)	173.38	45.63		
K97	124.31 (8.65)	173.71	57.69	33.29	$C^{\gamma}, 25.23 ; C^{\delta}, 28.92 ; C^{\epsilon}, . ; N^{\zeta}, .$
V98	122.42 (8.05)	175.71	60.69	32.76	$C^{\gamma 1}, 21.43 (0.92) ; C^{\gamma 2}, 20.87 (1.12)$
I99	131.44 (9.92)	175.42	59.67 (4.23)	39.48 (1.59)	$C^{\gamma 1}, 28.00 ; C^{\gamma 2}, 16.52 (1.03) ; C^{\delta 1}, 13.95 (0.58)$
E100	127.20 (8.49)	176.38	54.27 (4.98)	30.19 (1.82, .)	$C^{\gamma}, 36.23 (1.92, 2.20) ; C^{\delta}, .$
F101	120.02 (8.51)	171.97	55.87	41.58	$C^{\delta 1}, . ; C^{\delta 2}, . ; C^{e 1}, . ; C^{e 2}, . ; C^{\zeta}, . ;$
S102	113.35 (8.23)	173.19	57.67 (4.55)	64.86	
D103	126.79 (9.82)	174.90	53.66	45.21	
D104	
S105	.	177.83	61.58	.	
I106	124.40 (8.59)	177.76	65.56 (3.66)	. (2.09)	$C^{\gamma 1}, 29.65 ; C^{\gamma 2}, 17.02 (1.08) ; C^{\delta 1}, 13.00 (0.94)$
E107	119.94 (7.82)	178.78	59.32 (3.74)	.	$C^{\gamma}, 36.03 (2.05, 2.44) ; C^{\delta}, .$
A108	120.20 (8.05)	180.80	54.55 (4.05)	17.52 (1.52)	
R109	118.16 (7.70)	178.81	56.50	28.12	$C^{\gamma}, . ; C^{\delta}, . ; C^{\zeta}, . N^{\epsilon}, . ; N^{\eta 1}, . (*, *) ; N^{\eta 2}, . (*, *) ;$
Q110	118.01 (8.50)	177.77	58.76	27.07	$C^{\gamma}, . ; C^{\delta}, . N^{\epsilon 2}, .$
R111	117.01 (7.76)	179.38	59.83	29.40	$C^{\gamma}, . ; C^{\delta}, . ; C^{\zeta}, . N^{\epsilon}, . ; N^{\eta 1}, . (*, *) ; N^{\eta 2}, . (*, *) ;$
E112	120.55 (7.69)	179.44	58.68 (4.10)	29.38 (2.07, 2.31)	$C^{\gamma}, 35.82 (2.24, 2.51) ; C^{\delta}, .$
I113	121.85 (8.32)	177.96	64.35	37.00	$C^{\gamma 1}, 28.18 ; C^{\gamma 2}, 14.77 ; C^{\delta 1}, 13.97 (0.65)$
A114	120.01 (7.83)	180.06	54.79 (3.97)	17.29 (1.44)	
A115	120.67 (8.21)	.	54.44 (4.17)	17.49 (1.32)	
K116	.	176.46	57.95 (4.03)	31.23 (1.89, .)	$C^{\gamma}, 24.17 ; C^{\delta}, 28.63 ; C^{\epsilon}, 41.25 (2.88, .) ; N^{\zeta}, . ;$
H117	114.10 (7.31)	175.27	55.21	28.87	$C^{\delta 2}, . ; C^{e 1}, . ; N^{\delta 1}, * ; N^{\epsilon 2}, . ;$
G118	108.63 (8.09)	175.01	46.72		
I119	121.96 (8.29)	174.08	59.45	40.55 (1.46)	$C^{\gamma 1}, 29.08 ; C^{\gamma 2}, 15.82 (1.43) ; C^{\delta 1}, 12.94 (0.22)$
R120	129.15 (9.40)	174.85	53.70	29.93	$C^{\gamma}, . ; C^{\delta}, . ; C^{\zeta}, . N^{\epsilon}, . ; N^{\eta 1}, . (*, *) ; N^{\eta 2}, . (*, *) ;$
L121	128.61 (8.31)	177.03	55.89 (4.15)	42.40 (1.57, .)	$C^{\gamma}, . ; C^{\delta 1}, . (0.86) ; C^{\delta 2}, . (0.90)$
T122	116.18 (9.72)	174.68	62.19	70.27	$C^{\gamma 2}, 21.43 ;$
N123	118.17 (8.29)	172.83	52.91	43.13	$N^{\delta 2}, . ;$
H124	115.64 (9.01)	172.02	55.96	33.23	$C^{\delta 2}, . ; C^{e 1}, . ; N^{\delta 1}, * ; N^{\epsilon 2}, . ;$
S125	113.01 (9.47)	172.99	56.65	65.12	
L126	130.28 (9.61)	174.12	54.09	43.65	$C^{\gamma}, . ; C^{\delta 1}, . ; C^{\delta 2}, .$
Y127	126.30 (9.15)	174.64	56.65	42.84	$C^{\delta 1}, . ; C^{\delta 2}, . ; C^{e 1}, . ; C^{e 2}, . ; C^{\zeta}, .$
L128	120.44 (9.25)	174.55	52.78	44.45	$C^{\gamma}, 26.33 ; C^{\delta 1}, 24.13 (1.05) ; C^{\delta 2}, .$
Y129	116.51 (8.95)	176.19	55.02	42.33	$C^{\delta 1}, . ; C^{\delta 2}, . ; C^{e 1}, . ; C^{e 2}, . ; C^{\zeta}, .$
G130	106.87 (8.11)	170.56	45.73		
H131	116.44 (7.80)	173.73	53.80	32.03	$C^{\delta 2}, . ; C^{e 1}, . ; N^{\delta 1}, * ; N^{\epsilon 2}, . ;$
C132	124.03 (9.63)	176.37	60.30	28.61	
A133	130.90 (8.67)	177.26	53.87 (4.17)	19.02 (1.33)	
E134	116.51 (7.96)	175.14	54.90 (4.52)	31.45 (1.89, 1.98)	$C^{\gamma}, 35.31 ; C^{\delta}, .$
G135	111.46 (8.52)	172.91	44.69		
D136	119.80 (8.39)	176.41	52.62	40.82 (2.52, .)	
C137	126.34 (7.96)	176.76	59.07	30.75	
R138	122.31 (8.22)	177.73	58.21	28.65	$C^{\gamma}, . ; C^{\delta}, . ; C^{\zeta}, . N^{\epsilon}, . ; N^{\eta 1}, . (*, *) ; N^{\eta 2}, . (*, *) ;$
E139	115.15 (7.58)	175.42	54.99 (4.42)	29.93 (1.83, 2.22)	$C^{\gamma}, 35.41 (2.22, .) ; C^{\delta}, .$
D140	118.81 (7.35)	176.22	52.23	41.32	
E141	125.05 (8.95)	177.00	57.50 (4.12)	28.72 (1.84, .)	$C^{\gamma}, 35.20 (1.90, 1.97) ; C^{\delta}, .$
H142	117.24 (8.46)	175.69	54.52	.	$C^{\delta 2}, . ; C^{e 1}, . ; N^{\delta 1}, * ; N^{\epsilon 2}, . ;$
A143	122.84 (7.37)	178.94	54.12 (3.91)	19.07 (1.18)	
H144	111.60 (8.82)	175.12	54.15	.	$C^{\delta 2}, . ; C^{e 1}, . ; N^{\delta 1}, * ; N^{\epsilon 2}, . ;$

E145	118.87 (7.43)	177.26	56.50 (4.38)	29.65 (2.07, 2.16)	C^q , 36.18 (2.41, .); C^s , .
G146	109.68 (8.72)	173.42	45.03 (3.56, 3.82)		
K147	126.99 (7.86)	173.46	56.85 (4.15)	33.05	C^q , 28.45 (1.38, .); C^s , 28.45 ; C^e , 41.44 (2.96, .); N^c , .

Table 1 : resonance assignments of the monomer; (proton chemical shifts are given in parentheses).

residue	N	C	C ^α
T1			
D2			
N3			
N4			
T5	116.11 (8.04)	175.68	65.42
A6	123.30 (8.04)	180.41	54.49
L7	116.27 (7.57)	178.14	57.16
K8	119.11 (7.78)	181.71	59.10
K9	120.74 (8.78)	177.66	58.06
A10	119.47 (7.31)	176.90	51.12
G11	106.32 (7.91)	174.21	44.67
L12	120.33 (7.96)	175.80	52.35
K13	120.69 (8.03)	177.01	55.41
V14	124.28 (8.64)	175.67	63.91
T15	116.90 (6.78)	173.75	57.80
L16	122.14 (9.10)		
P17		178.43	65.72
R18	112.07 (6.99)	177.83	59.57
L19	117.77 (8.06)	179.53	57.16
K20	117.62 (8.51)	178.61	56.54
I21	117.84 (8.06)	177.37	65.27
L22	119.65 (7.94)	177.73	57.88
E23	116.43 (8.01)	180.29	58.69
V24	118.51 (7.79)	179.36	65.77
L25	120.11 (8.10)	177.19	56.60
Q26	113.71 (7.50)	176.95	55.31
E27	123.26 (7.66)		
P28		177.62	64.24
D29	114.36 (8.50)	176.24	54.38
N30	117.73 (7.85)	173.28	51.70
H31	116.70 (7.50)	174.92	56.43
H32	116.66 (7.81)	175.04	54.78
V33	118.40 (8.78)	174.73	59.08
S34	121.22 (9.19)	175.03	55.90
A35	123.66 (9.69)	179.13	54.70
E36	115.59 (8.81)	179.17	60.60
D37	120.81 (8.07)	179.13	56.43
L38	124.08 (8.17)	178.26	58.30
Y39	119.08 (8.62)	175.97	60.23
K40	117.55 (7.89)	178.60	58.73
R41	118.88 (7.66)	178.38	57.26
L42	119.40 (8.06)	179.43	57.22
I43	119.57 (8.06)	181.64	62.63
D44	123.86 (8.22)	178.31	56.40
M45	116.46 (7.81)	176.44	55.79
G46	107.76 (8.06)	174.98	44.61
E47	118.44 (7.90)	175.97	54.00
E48	122.77 (8.85)	175.10	54.38
I49	123.79 (7.51)	174.79	59.70
G50	112.15 (8.47)	174.50	44.24
L51	124.74 (8.31)	178.13	57.48
A52	118.58 (8.63)	181.25	54.59
T53	116.32 (7.36)	174.86	65.67
V54	121.97 (7.76)	177.55	66.76
Y55	115.56 (8.13)	177.96	62.39
R56	118.95 (7.82)	179.13	59.11
V57	119.49 (8.54)	177.96	65.00
L58	118.44 (8.09)	178.90	57.43
N59	117.29 (8.18)	178.20	55.85
Q60	120.35 (8.06)	180.24	58.02
F61	119.78 (9.20)	178.09	56.34
D62	125.27 (8.63)	179.65	55.74
D63	120.72 (8.07)	178.01	56.85
A64	116.80 (7.94)	177.61	51.46
G65	106.92 (8.04)	174.92	45.03
I66	119.79 (8.37)	176.43	62.37
V67	107.67 (7.05)	174.33	56.97
T68	115.45 (9.10)	172.45	60.41
R69	127.60 (8.76)	174.51	53.84
H70	126.27 (8.92)	173.86	53.89
N71	121.03 (8.56)	174.38	51.68
F72	121.98 (8.63)	175.62	55.55
E73	121.76 (8.64)	175.97	55.53
G74	.	.	.
G75	107.76 (8.20)	174.27	44.71

K76	120.73 (7.54)	176.02	55.06
S77	117.92 (8.53)	173.79	57.42
V78	117.74 (8.55)	173.37	59.16
F79	120.23 (8.97)	174.32	56.56
E80	119.88 (8.66)	175.80	52.64
L81	127.20 (9.13)	177.24	55.98
T82	120.44 (8.34)	175.14	61.89
Q83	122.60 (8.51)	.	.
Q84	120.33 (8.44)	175.72	55.48
H85	.	.	.
H86	.	.	.
H87	.	.	.
D88	.	.	.
H89	.	.	.
L90	.	.	.
I91	.	.	.
C92	.	.	.
L93	.	.	.
D94	.	.	.
C95	.	.	.
G96	.	.	.
K97	.	.	.
V98	121.93 (8.18)	175.96	61.66
I99	125.08 (8.20)	175.73	60.04
E100	124.95 (8.32)	175.78	55.38
F101	121.25 (8.26)	175.60	56.76
S102	117.29 (8.31)	174.21	57.21
D103	122.53 (8.37)	176.14	53.94
D104	.	.	.
S105	115.99 (8.21)	175.45	58.37
I106	122.65 (8.15)	177.42	62.26
E107	122.05 (8.41)	177.95	57.95
A108	122.61 (8.09)	179.54	53.52
R109	118.50 (8.03)	.	.
Q110	.	.	.
R111	.	.	.
E112	.	.	.
I113	.	.	.
A114	.	.	.
A115	124.35 (8.12)	178.71	52.93
K116	120.98 (7.97)	178.89	52.62
H117	118.04 (8.01)	176.03	55.89
G118	108.94 (8.16)	174.10	44.97
I119	119.67 (7.93)	175.96	60.19
R120	124.72 (8.38)	176.03	55.01
L121	123.81 (8.34)	177.44	54.35
T122	.	.	.
N123	.	.	.
H124	.	.	.
S125	.	.	.
L126	122.88 (8.15)	177.19	55.02
Y127	119.29 (7.97)	175.91	57.12
L128	122.17 (7.91)	.	.
Y129	118.64 (7.91)	176.44	57.05
G130	109.18 (8.22)	173.80	44.69
H131	120.53 (7.97)	176.42	.
C132	.	.	.
A133	.	.	.
E134	116.64 (8.26)	176.44	55.84
G135	109.20 (8.22)	173.81	44.79
D136	119.77 (8.20)	176.21	53.32
C137	118.47 (8.41)	174.67	55.02
R138	121.36 (8.39)	176.48	55.53
E139	121.55 (8.54)	176.26	55.98
D140	120.55 (8.32)	176.49	53.45
E141	121.11 (8.34)	176.50	56.41
H142	119.06 (8.25)	175.32	55.14
A143	124.17 (8.03)	177.54	51.94
H144	118.21 (8.25)	175.51	55.40
E145	121.76 (8.26)	176.85	55.95
G146	110.32 (8.44)	173.32	44.68
K147	125.67 (7.79)	181.57	56.86

La protéine FUR (Ferric Uptake Regulator) est un régulateur global ubiquitaire chez les bactéries Gram-négatives. Sa liaison au Fe^{2+} , *in vivo*, entraîne la répression de l'expression des gènes qu'elle contrôle. Ce travail est une étude structurale par RMN de la forme dimérique non activée de FUR d'*Escherichia coli*, un dimère de 2*17 kDa contenant un ion zinc par monomère. Une forme monomérique oxydée, capable de dimériser en présence de réducteur et de zinc, a également été isolée et étudiée. Le dichroïsme circulaire et la RMN montrent que la dimérisation entraîne une structuration du domaine C-terminal lors de l'incorporation du zinc. Les structures secondaires du domaine N-terminal du monomère et du dimère sont très proches. Seuls les premiers résidus sont structurés en hélice α dans le monomère et déstructurés dans le dimère non activé. Cette hélice, observée dans le dimère activé de FUR de *P. aeruginosa*, pourrait jouer un rôle dans le mécanisme de régulation. Une protéine tronquée (FUR₁₋₈₂) a été construite, purifiée, cristallisée. Sa structure est superposable à celle du domaine N-terminal de FUR de *P. aeruginosa* et le spectre ^1H - ^{15}N -HSQC est superposable aux signaux du domaine N-terminal de FUR monomère. L'étude, par anisotropie de fluorescence, de la liaison du monomère et du dimère à l'ADN montre qu'ils se lient spécifiquement à l'ADN en présence de métal, contrairement à la forme tronquée. L'affinité du monomère pour l'ADN est 5 fois plus faible que celle du dimère en excès de métal. L'ensemble de ces données nous a permis de proposer un mécanisme de dimérisation de FUR d'*E. coli* ainsi qu'un mécanisme d'activation mettant en jeu cette hélice α N-terminale.

Mots-clefs : Dimérisation, FUR, Ferric Uptake Regulator, cystéines, zinc, RMN, dichroïsme circulaire, anisotropie de fluorescence, cristallographie.

Titre : Role of the zinc and the cysteines in the dimerization of the Ferric Uptake Regulator (FUR) from *E. coli* : a structural approach using NMR

The FUR protein (Ferric Uptake Regulator) is a global regulator ubiquitous in Gram-negative bacteria. Binding of Fe^{2+} *in vivo* activates the FUR protein for DNA binding. Fe-FUR binds to the promoter of FUR regulated genes, causing their repression. This work consists of an NMR structural study of the non-activated dimer of FUR (2*17 kDa) which contains one zinc ion per monomer. The FUR monomer was also studied and does not contain the zinc ion. Reduction of the cysteines, and binding of zinc to the protein, leads to dimerization. Circular dichroism and NMR showed that folding of the C-terminal domain of the monomer (dimerization domain) occurs upon dimerization. The secondary structure observed in the monomer and the dimer are similar, except for the first residues. In the monomer, these are organized as a helix while they are unfolded in the non-activated dimer. As this first helix is observed in the activated dimer of *P. aeruginosa*, we propose it plays a role in the regulation mechanism. A truncated protein named FUR₁₋₈₂ was constructed, purified, and crystallized. Its structure is superimposable onto the N-terminal domain structure of *P. aeruginosa* FUR and the ^1H - ^{15}N -HSQC spectra of FUR₁₋₈₂ and FUR monomer are nearly identical. Binding of the monomer and the dimer to the DNA consensus sequence study, using fluorescence anisotropy, showed that both forms are able to bind DNA specifically, but with different affinities. The monomer has a 5 fold decreased affinity compared to the dimer in presence of excess metal. Overall, the results obtained allowed us to propose a dimerization mechanism of *E. coli* FUR and an activation mechanism with a role for the N-terminal α helix.

Keywords : Dimerization, FUR, Ferric Uptake Regulator, cysteines, zinc, NMR, circular dichroism, fluorescence anisotropy, crystallography.